

**CRISTINA RAMÍREZ TORO**

**USO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS NA  
ALIMENTAÇÃO DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* COMO  
INIBIDORAS DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E  
ESTIMULANTES DO SISTEMA IMUNE**

TESE APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO, SAÚDE HUMANA E ANIMAL, SETOR DE TECNOLOGIA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.

**ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS RICARDO SOCCOL.**

**COORIENTADOR: PROF. DR. ELPÍDIO BELTRAME**

**CURITIBA**

**2005**

## DEDICATÓRIA

A minhas filhas Constanza e Marcela por seu apoio incondicional e pelos anos cedidos.

A meu grande amigo Germán que esteve sempre presente em todas as situações apesar da distância.

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Carlos Ricardo Soccol e Dr. Elpídio Beltrame, pelas orientações e apoio.

Aos professores Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, Dr. José Luis Parada e Dra. Luciana Vanderberghe, por terem aceito participar da Comissão Examinadora, com suas valiosas contribuições na avaliação da tese.

À Universidade Federal do Paraná, em particular, ao Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos.

Ao Dr. José Angel Rodríguez-León, por seus ensinamentos, por sua amizade e exemplo de vida.

Às professoras Dra. Adenise L. Woiciechowski e Dra. Adriane B. P. Medeiros, pela amizade, colaboração e contribuições, sempre oportunas.

À Universidad del Valle pela Comissão de Estudos, outorgada para realização do doutorado.

Às amigas Mitiyo Miyaoka, Marlene Soares, Elza Ciffoni, Herta Dalla Santa, Letícia Karam, Vitória A. Yamada, por todo seu apoio e valiosa amizade.

Ao meu estagiário “estrela”, Marcos Herber, por sua dedicação e colaboração durante os tempos difíceis.

Ao pessoal do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, Dr. Edegar Roberto Andreatta e Dr. Luis Vinatea, pela amizade, apoio e colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, José Luis Mourino, Celso Buglione, Fabiola Santiago e Felipe Vieira, com quem compartilhei experiências inesquecíveis e valiosas.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela agradável convivência do dia a dia durante o tempo que ali permaneci.

A todas as pessoas que contribuíram, de uma ou outra maneira, na execução deste trabalho.

Principalmente a Deus, por permitir encontrar neste caminho tantas pessoas maravilhosas, cuja ajuda facilitou a conclusão deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE</b>	<b>DE</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>4</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1 CULTIVO DE CAMARÕES MARINHOS NO BRASIL .....	5
3.2 ENFERMIDADES NO CULTIVO DE CAMARÃO MARINHO .....	6
3.2.1 IHHNV (Infecção viral na hipoderme e necrose do tecido hematopoiético) .....	7
3.2.2 Vírus da síndrome de Taura (TSV) .....	8
3.2.3 Vírus da mancha branca (WSSV) .....	8
3.2.4 Hepatopancreatite necrosante (NHP) .....	9
3.2.5 Vibrioses.....	10
3.3 RESPOSTA IMUNE EM CRUSTÁCEOS .....	12
3.4 USO DE ANTIBIÓTICOS EM CULTIVO DE CAMARÃO .....	13
3.4.1 Resistência no meio ambiente .....	15
3.4.2 Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos.....	16
3.4.3 Bases genéticas da resistência bacteriana .....	17
3.4.4 Resistência intrínseca .....	17
3.4.5 Resistência adquirida .....	18
3.4.6 Mecanismos bioquímicos de resistência .....	18

3.5	USO DE PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS NA AQUICULTURA.....	19
3.5.1	Definição de microrganismos probióticos .....	20
3.5.2	Definição de probióticos em aquicultura.....	21
3.5.3	Bactérias lácticas como probióticos .....	23
3.6	CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	23
3.6.1	Fermentação ácido láctica.....	25
3.6.2	Homofermentação .....	25
3.6.3	Heterofermentação.....	26
3.6.4	Agentes inibidores .....	26
3.6.4.1	Ácido láctico .....	27
3.6.4.2	Peróxido de Hidrogênio .....	27
3.6.4.3	Diacetil.....	28
3.6.4.4	Bacteriocinas .....	28
3.6.4.5	Classes de bacteriocinas.....	28
3.6.4.6	Propriedades das bacteriocinas .....	29
3.6.4.7	Mecanismos de ação.....	30
3.7	INÓCULOS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NO ALIMENTO COMO SUBSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS .....	31
3.8	ESTIMULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE COM PROBIÓTICOS..	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	MICRORGANISMOS .....	34
4.1.1	Local de captura.....	34
4.1.2	Isolamento e seleção de cepas de bactérias lácticas.....	35
4.1.3	Manutenção das cepas .....	36
4.2	SELEÇÃO DAS CEPAS .....	36
4.2.1	Análise do perfil da produção de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência ( HPLC).....	36
4.2.2	Poder de inibição frente aos patógenos .....	37
4.2.2.1	Ensaio de inibição.....	37

4.2.2.2	Ensaios comparativos de inibição das bactérias e antibióticos frente aos patógenos .....	38
4.2.2.3	Estudo de viabilidade frente à concentração de sais biliares .....	38
4.2.2.4	Produção de gás .....	39
4.2.2.5	Atividade de catalase .....	39
4.2.2.6	Estudo de tolerância a NaCl. ....	39
4.2.2.7	Estudo de viabilidade sob diferentes concentrações de pH .....	39
4.2.2.8	Detecção dos isômeros do ácido láctico.....	40
4.2.2.9	Provas bioquímicas .....	41
4.2.2.10	Identificação molecular das cepas selecionadas.....	43
4.2.3	Seleção de meios de cultura para produção de biomassa ...	44
4.3	CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO .....	44
4.3.1	Determinação de pH .....	45
4.3.2	Contagem de microrganismos viáveis em placa .....	45
4.3.3	Determinação de açúcar total.....	46
4.3.4	Determinação da presença de ácido láctico por HPLC .....	46
4.3.5	Cálculos da fermentação.....	47
4.4	ELABORAÇÃO DOS INÓCULOS .....	47
4.4.1	Viabilidade dos inóculos .....	48
4.4.2	Determinação da atividade da água (Aw).....	48
4.4.3	Determinação de pH .....	50
4.5	INCLUSÃO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS NA RAÇÃO DE LARVAS E camarões .....	50
4.6	ENSAIOS <i>in vivo</i> COM APLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SELECIONADOS. ....	51
4.6.1	Ensaios de sobrevivência e crescimento larval .....	51
4.6.1.1	Crescimento larval .....	52
4.6.1.2	Sobrevivência .....	53
4.6.1.3	Aderência intestinal das bactérias lácticas .....	53

4.7	ENSAIO DESAFIO COM <i>Vibrio harveyi</i> .....	53
4.7.1	Estudo do efeito de interação competitiva das cepas probióticas frente ao <i>V. harveyi</i> .....	53
4.7.1.1	Preparação dos inóculos:.....	54
4.7.1.2	Efeito probiótico das cepas selecionadas para proteção... 54	
4.8	ENSAIOS DE DESAFIO COM <i>Vibrio alginolyticus</i> EM CAMARÕES JUVENIS PARA VERIFICAR O EFEITO IMUNO- ESTIMULANTE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS .....	56
4.8.1	Avaliação do efeito imunoestimulante .....	57
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
5.1	MICRORGANISMOS .....	60
5.1.1	Seleção das cepas .....	60
5.2	PERFIL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	61
5.3	PODER DE INIBIÇÃO FRENTE AOS PATÓGENOS .....	64
5.4	ESTUDO DE RESISTÊNCIA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS BILIARES .....	71
5.5	PRODUÇÃO DE GÁS E DETERMINAÇÃO DE CATALASE .....	73
5.6	TOLERÂNCIA A NaCl .....	74
5.7	ESTUDO DE VIABILIDADE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE pH.....	76
5.8	DETECÇÃO DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO .....	77
5.9	ENSAIOS COMPARATIVOS DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E ANTIBIÓTICOS FRENTE A PATÓGENOS.....	79
5.10	PROVAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	84
5.11	IDENTIFICAÇÃO POR PCR DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS .....	85
5.12	SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO.....	87
	DE BIOMASSA.....	87
5.13	CINÉTICAS DE FERMENTAÇÃO .....	91
5.13.1	Cinética comparativa da cepa 20 .....	93
5.13.2	Cinética comparativa da cepa 21 .....	96



	5.13.3 Cinética comparativa cepa 2 .....	99
	5.13.4 Cinética comparativa da cepa 24 .....	101
	5.13.5 Cinética comparativa da cepa 25 .....	103
	5.14 ESTUDO DE VIABILIDADE DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS..	107
	5.15 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> COM APLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SELECIONADO.....	114
	5.15.1 Crescimento larval.....	114
	5.15.2 Sobrevivência das pós-larvas.....	117
	5.15.2.1 Aderência e colonização intestinal das bactérias lácticas .....	119
	5.15.3 Desafio com <i>Vibrio harveyi</i> .....	122
	5.15.3.1 Estudo de interação competitiva.....	122
	5.15.3.2 Desafio com <i>V. harveyi</i> .....	123
	5.15.4 Ensaios de desafio com <i>Vibrio alginolyticus</i> em camarões juvenis provenientes de lotes com diagnóstico positivo por PCR para WSSV. para verificar o efeito imuno- estimulante das bactérias lácticas.....	126
	5.15.4.1 Sobrevivência .....	126
	5.15.4.2 Resultados da resposta imune .....	127
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>132</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>134</b>

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- CEPAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS PARA EFETUAR OS TESTES DE INIBIÇÃO.....	37
QUADRO 2- FORMULAÇÃO DOS MEIOS TESTADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ELABORAÇÃO DE INÓCULOS.....	44
QUADRO 3- TRATAMENTOS EFETUADOS PARA DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA.....	51
QUADRO 4- TRATAMENTOS EFETUADOS NO ENSAIO DE DESAFIO COM <i>V. ibrio. harveyi</i> .....	55
QUADRO 5- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS 21 CEPAS SELECIONADAS NA PRIMEIRA ETAPA.....	61
QUADRO 6- PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS PELAS 21 CEPAS SELECIONADAS NA PRIMEIRA ETAPA.....	62
QUADRO 7- CAPACIDADE DE INIBIÇÃO FRENTE A PATÓGENOS.....	65
QUADRO 8- CAPACIDADE DE INIBIÇÃO FRENTE A PATÓGENOS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS EM ESTUDO.....	66
QUADRO 9- RESULTADOS DE VIABILIDADE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS BILIARES COM AS BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO.....	72
QUADRO 10- RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE GÁS E ATIVIDADE DE CATALASE.....	74
QUADRO 11- VIABILIDADE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO .....	75
QUADRO 12- VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO A DIFERENTES NÍVEIS DE pH.....	76
QUADRO 13- ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO PRODUZIDOS PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	78

QUADRO 14- ENSAIO COMPARATIVO DO EFEITO DE INIBIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS E BACTÉRIAS LÁCTICAS FRENTE AOS PATÓGENOS SELECIONADOS .....	79
QUADRO 15- ENSAIO COMPARATIVO DO EFEITO INIBIDOR DOS ANTIBIÓ- TICOS E AS BACTÉRIAS LÁCTICAS SELECIONADAS FRENTE AOS MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS MAIS COMUNS EM AQUICULTURA.....	80
QUADRO 16- PRINCIPAIS CARBOIDRATOS FERMENTADOS PELAS CEPAS SELECIONADAS.....	84
QUADRO 17- TESTE DE VIABILIDADE EM UFC/g E COMPORTAMENTO DO pH NOS MEIOS SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	89
QUADRO 18- TESTE DE VIABILIDADE EM UFC/g E COMPORTAMENTO DO pH NOS MEIOS SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	90
QUADRO 19- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 2 NOS MEIOS SELECIONADOS .....	94
QUADRO 20- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 20.....	95
QUADRO 21- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 21 NOS MEIOS SELECIONADOS .....	97
QUADRO 22- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 21.....	98
QUADRO 23- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 2 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	99
QUADRO 24- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 2.....	100

QUADRO 25- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 24 NOS MEIOS SELECIONADOS .....	101
QUADRO 26- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 24.....	103
QUADRO 27- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 25 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	104
QUADRO 28- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 25 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	105
QUADRO 29- COMPARAÇÃO DAS VIABILIDADES DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS ELABORADOS COM AS CEPAS SELECIONADAS.....	107
QUADRO 30- VALORES OBTIDOS PARA CRESCIMENTO EM CINCO SEMANAS DE TRATAMENTO COM PROBIÓTICO.....	115
QUADRO 31- ANÁLISE ESTATÍSTICO (DMS) DE SOBREVIVÊNCIA NOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	118
QUADRO 32- RESULTADOS DE INTERAÇÃO COMPETITIVA ENTRE AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO E <i>Vibrio</i> <i>Harveyi</i> A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	123
QUADRO 33- SOBREVIVÊNCIA DAS PÓS-LARVAS APÓS INÓCULO COM <i>Vibrio harveyi</i> .....	124
QUADRO 34- MORTALIDADE DOS CAMARÕES APÓS INÓCULO COM <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	127
QUADRO 35- NÚMERO DE HEMÓCITOS POR mL NA HEMOLINFA ANTES E DEPOIS DA INOCULAÇÃO DE <i>Vibrio alginolyticus</i> ...	128
QUADRO 36- TEMPO DE COAGULAÇÃO (SEGUNDOS) DA HEMOLINFA ANTES E DEPOIS DA INOCULAÇÃO DE <i>Vibrio alginolyticus</i> ....	129
QUADRO 37- CONCENTRAÇÃO DE VIBRIO NA HEMOLINFA (UFC/mL).....	130

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- LUGAR DA CAPTURA DOS ESPÉCIMES, BAHÍA DE BUENAVENTURA.....	35
FIGURA 2- ESQUEMA DE APLICAÇÃO DO MÉTODO DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO.....	40
FIGURA 3- GALERIAS API 50 CHL UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS SELECIONADAS.....	42
FIGURA 4- BIORREATOR UTILIZADO NAS CINÉTICAS DE FERMENTAÇÃO.....	45
FIGURA 5- FLUXOGRAMA DE ELABORAÇÃO DOS INÓCULOS.....	49
FIGURA 6- CONDICIONAMENTO DOS AQUÁRIOS NO EXPERIMENTO SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO LARVAL.....	52
FIGURA 7- ADEQUAÇÃO EFETUADA NOS ENSAIOS DE DESAFIO COM <i>V. harveyi</i> PARA PL 2.....	55
FIGURA 8- EXTRAÇÃO DE HEMOLINFA.....	58
FIGURA 9- HEMOLINFA EXTRAÍDA PARA ANÁLISE DE HEMÓCITOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	58
FIGURA 10- CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DESENVOLVIDAS EM MEIO COM AZUL DE ANILINA.....	60
FIGURA 11- HALO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA APESENTADO PELAS CEPAS LÁCTICAS FRENTE A <i>E. coli</i> .....	67
FIGURA 12- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>Salmonella tiphy</i> DAS CEPAS LÁCTICAS 2 E 20.....	67
FIGURA 13- INIBIÇÃO FRENTE AO <i>Vibrio cholerae</i> PELAS CEPAS LÁCTICAS.....	68
FIGURA 14- INIBIÇÃO FRENTE A <i>Serratia marcesens</i> PELAS CEPAS LÁCTICAS DO ESTUDO.....	68

<b>FIGURA 15- HALO DE INIBIÇÃO DAS CEPAS 2 E 20 FRENTE AO</b> <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	69
<b>FIGURA 16- INIBIÇÃO FRENTE A <i>Flexibacter maritimus</i> PELA CEPAS</b> <b>LÁCTICAS 20 E 21</b> .....	69
<b>FIGURA 17- ADESÃO À PAREDE CELULAR DE <i>Flexibacter maritimus</i></b> <b>PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS</b> .....	70
<b>FIGURA 18- ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO DAS CEPAS 2, 20 E 25</b> .....	78
<b>FIGURA 19- INIBIÇÃO FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> PELOS ANTI-</b> <b>BIÓTICOS CLORANFENICOL, NEOMICINA, AZTREONAM E</b> <b>AS CEPAS LÁCTICAS 24 E 2</b> .....	81
<b>FIGURA 20- ESTUDO COMPARATIVO DE INIBIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS</b> <b>VANCOMICINA, AMOXACILINA, CLORANFENICOL, NEOMI-</b> <b>CINA DA CEPA 20 FRENTE A <i>Listeria monocitogenes</i></b> .....	81
<b>FIGURA 21- EFEITO INIBIDOR DOS ANTIBIÓTICOS VANCOMICINA,</b> <b>CLORAMFENICOL, NEOMICINA E A CEPA 20 FRENTE A</b> <i>Serratia marsecens</i> .....	82
<b>FIGURA 22- EFEITO INIBIDOR DOS ANTIBIÓTICOS E A CEPA 2 FRENTE</b> <i>A <i>Vibrio alginolyticus</i></i> .....	83
<b>FIGURA 23- EFEITO INIBITÓRIO DOS ANTIBIÓTICOS E A CEPA 2 Frente</b> <i>A <i>Flexibacter maritimus</i></i> .....	83
<b>FIGURA 24- ÁRVORE FILOGENÉTICA DEMOSTRANDO A RELAÇÃO</b> <b>FILOGENÉTICA DAS CEPAS 20, 21, E 2 COM AS LINHAGENS</b> <b>DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM BASES EM</b> <b>SEQÜÊNCIAS DE rDNA 16S</b> .....	86
<b>FIGURA 25- COMPARAÇÃO MORFOLÓGIA DAS CEPAS 20, 21, E 2</b> <b>SELECIONADAS COM AS QUE SE EFETUARAM AS CINÉ-</b> <b>TICAS PARA ESTUDO DE CRESCIMENTO MICROBIANO</b> .....	92
<b>FIGURA 26- MORFOLOGIA DAS CEPAS ISOLADAS DE INÓCULO</b> <b>COMERCIAL TESTADAS COMO COMPARAÇÃO</b> .....	93

<b>FIGURA 27- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E Ph DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS, DURANTE QUATRO MESES DE SEGUIMENTO</b>	<b>110</b>
<b>FIGURA 28- COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (Aw) E VIABILIDADE DURANTE QUATRO MESES DE SEGUIMENTO</b>	<b>112</b>
<b>FIGURA 29- PRESENÇA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM EPITÉLIO INTESTINAL DOS CAMARÕES TRATADOS COM PROBIÓTICO</b>	<b>120</b>
<b>FIGURA 30- PRESENÇA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NA REGIÃO DE INTestino CEGO DOS CAMARÕES TRATADOS COM PROBIÓTICOS</b>	<b>121</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 20 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	94
GRÁFICO 2- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 21 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	98
GRÁFICO 3- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 2 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	100
GRÁFICO 4- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 24 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	102
GRÁFICO 5- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 25 NOS MEIOS SELECIONADOS.....	104
GRÁFICO 6- COMPORTAMENTO DA VIABILIDADE DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS.....	108
GRÁFICO 7- COMPORTAMENTO E EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS DURANTE QUATRO MESES DE SEGUIMENTO.....	111
GRÁFICO 8- EVOLUÇÃO DO CRESCIMENTO LARVAL DE ACORDO COM OS TRATAMENTOS APLICADOS.....	116
GRÁFICO 9- PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA LARVAL COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	118
GRÁFICO 10- PORCENTAGENS DE SOBREVIVÊNCIA NO DESAFIO COM <i>Vibrio harveyi</i> .....	124



**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Aw</b>	Atividade de água
<b>BCCM</b>	Belgium Coordinated Collection of Microorganisms
<b>CENAIM</b>	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IHHNV</b>	Infeção viral na hipoderme e necrose do tecido hematopoiético
<b>LCM</b>	Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC)
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose letal
<b>LM</b>	Bactérias Lactomarinhas
<b>μ Máxima</b>	Velocidade específica de crescimento
<b>NHP</b>	Hepatopancreatite necrosante
<b>PQBA</b>	Centro Multidisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
<b>THC</b>	Contagem Total de Hemócitos
<b>tm</b>	Toneladas métricas
<b>TSV</b>	Vírus Síndrome de Taura
<b>UFC/g</b>	Unidades Formadoras de Colônias por grama
<b>UFC/mL</b>	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
<b>WSSV</b>	Vírus da Mancha Branca

## RESUMO

Considerando o potencial mundial da indústria aquícola, entre os principais fatores de risco econômico a serem considerados estão as doenças de organismos aquáticos. O uso indiscriminado de medicamentos, como antibióticos, e de substâncias químicas para o controle e tratamento na aquícultura, apresenta implicações negativas à saúde humana e ao meio ambiente, não sendo atualmente recomendados. A aplicação de agentes probióticos para inibição de patógenos é um método seguro e efetivo que sabidamente pode substituir os antibióticos como promotores da saúde e do crescimento animal. Este estudo teve por objetivo isolar, selecionar e caracterizar bioquimicamente cepas de bactérias lácticas com qualidades probióticas, para aplicação na criação de camarões, possibilitando a substituição dos antibióticos, aumentando a sobrevivência e estimulando o sistema imune do hospedeiro. Foram selecionadas três culturas homolácticas (DL e L+), resistentes a baixos valores de pH, concentrações elevadas de NaCl e altas concentrações de bile, com atividade inibitória sob *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e outras. Uma das cepas isoladas foi identificada como *Pediococcus parvulus*, mediante provas moleculares. A produção de biomassa das três cepas foi escalonada, liofilizada e sua estabilidade acompanhada ao longo de quatro meses. Ensaio da aplicação destas biomassas *in vivo* foram conduzidos com camarão *Litopenaeus vannamei*, na presença de vibrios patógenos, com e sem administração prévia das bactérias lácticas selecionadas. Os resultados dos testes demonstraram diferenças significativas quanto à sobrevivência e à resposta imune dos animais, favoráveis àqueles tratados com alimentação suplementada com os probióticos. Foi demonstrado que *P. parvulus*, além de exercer um amplo espectro de inibição frente a vibrios e outros patógenos, tanto *in vitro* como *in vivo*, apresenta também ação imunoestimulante para proteção do camarão. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que as cepas lácticas selecionadas apresentam boas características probióticas para utilização em sistemas de cultivo de camarões.

Palavras chaves: camarão, bactérias lácticas, probióticos, inibição de patógenos, imunoestimulação.

## ABSTRACT

Aquatic culture of shrimps has important economic potential in the world. The diseases in aquatic organisms is considered one of the most significant economic risks. The use of antibiotics for prevention and treatment of diseases has negative implications on environment and human health. Nowadays the use of these substances are not recommended in aquaculture. The application of probiotic agents to control the pathogenic microorganisms is a safe and viable method that may be used in substitution to antibiotics, increasing the health and animal growth.

The aim of this work was to isolate, select and characterize biochemically the lactic acid bacteria from shrimps and carry out an investigation of their probiotic qualities, in order to replace the antibiotic application to increase the host survival and yield.

Among 20 isolates, three homolactic cultures (DL and L+) which were resistant to low pH levels, high concentration of NaCl and resistant to high concentration of bile, were selected. These strains show inhibitory activity on *Vibrio alginolyticus*, *V. Cholerae*, *V. Harveyi*, *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, among others. One of these lactic bacteria was identified as *Pediococcus parvulus* by molecular genotyping. Different culture media were used to prepare lyophilized biomass and its stability was evaluated. Experiments *in vivo* were carried out using the shrimps *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio* spp. and treated with or without the probiotic lactic acid bacteria selected in this study. The results showed statistical differences ( $p < 0.05$ ) concerning to the increase of the shrimp survival with probiotic added feed; immunological stimulation was also observed in *P. parvulus*. The probiotics used in this study were successful as wide inhibitor agents against *Vibrio* and other pathogens, and they may be recommended for feeding the current farming shrimp *Litopenaeus vannamei*.



## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura no mundo converteu-se numa das mais importantes áreas comerciais nos últimos 50 anos. Documentos da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONAL) citados por GOBERFISH (1999), indicam que a aquicultura representa mais de 25% da produção mundial, com um custo de US\$45,5 bilhões, sendo que a maior parte desta produção é destinada ao consumo humano. A aquicultura tem apresentado um crescimento de 10% ao ano, o que significa um aumento notável com relação à pesca de captura tradicional (CURRIE, 2000).

Segundo FILOSE *et al.*, (2003), a Tailândia é o maior exportador de camarão no mundo, e líder em representações de “valor agregado”. Porém nos últimos anos, foram registradas significativas exportações da China, Vietnam, Índia e Brasil. A produção mundial de camarão de todas as espécies estima-se entre 1,2 a 1,5 mil milhões de toneladas métricas; e tende a continuar crescendo. Afirma-se que o maior desenvolvimento na produção de camarão será devido a aquicultura.

Atualmente enfoca-se a obtenção de um grande número de safras de camarão de porte pequeno. Para os próximos dois anos espera-se produzir cerca de 90 mil toneladas de camarão *Litopenaeus vannamei*. No Brasil, 80% da produção do camarão é de cultivo e 97% é exportado (FAENIA, 2004). O país dispõe de 300.000 hectares propícios para a carcinicultura marinha e somente no Nordeste, entre 1999 e 2003 foram previstas ações de investimentos envolvendo a construção de 30.000 hectares de novos viveiros e diversas unidade de apoio operacional, com um investimento da ordem de R\$ 950 milhoes (Min. Da Agricultura e Abastecimento, Seção de Aquicultura e Pesca, Brasil, 2004).

De acordo com GARCÍA (2003), considerando o potencial da indústria aquícola no mundo e no Brasil, as enfermidades em organismos aquáticos, representam uns dos principais fatores de risco. Em geral a indústria de cultivo de camarão na América Latina tem sofrido muitas baixas devido à presença de microrganismos patogênicos. O uso de medicamentos e substâncias químicas

como antibióticos, são tratamentos que pelas implicações negativas relacionadas com a saúde humana e ao meio ambiente, tem sido relegados e não recomendados para uso na aquicultura.

O uso de antibióticos em alimentos de origem animal é motivo de preocupação, já que a resistência a antibióticos da bactéria patogênica associada ao animal é aumentada e transmitida a humanos. Embora o tratamento com antibióticos tenha uma resposta mais rápida às doenças bacterianas, pode ser contraproducente, devido ao fato de que os antibióticos podem causar um aumento da resistência dos patógenos. Novas cepas surgiram ao longo do tempo em resposta ao uso de antibióticos e muitos destes patógenos se tornaram mais resistentes, aumentando a mortalidade na indústria de carcinicultura (Mac MILLAN, 2003).

É conhecida também a resistência a antibióticos desenvolvida por patógenos que estão presentes em animais em cativeiro que vão servir como fonte de alimento humano, levando à resistência a antibióticos como tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol, quinolonas etc. (DIXON, 2001).

Muitas das fazendas produtoras de camarão na Ásia e América Latina, utilizam antibióticos em grande quantidade, incluindo fluoroquinonas como a sarafloxacina, norfloxacina e outras. É difícil determinar o uso total anual, mas uma estimativa foi calculada entre 1.000- 2.000 ton.m/ano. As fluoroquinonas são consideradas como a última linha de defesa para humanos com resistência a múltiplas bactérias, e por tanto não devem ser utilizados na produção animal. (MacMILLAN 2002, 2003).

Outro fator que pode afetar o mercado mundial de camarão a curto prazo é o risco de embargo pelo emprego de antibióticos proibidos pelas autoridades sanitárias dos países consumidores e produtores (FILOSE, 2003).

Há necessidade de um melhor manejo na prevenção de doenças que permitam um bom desenvolvimento e salubridade dos produtos de cultivo. Os camarões desenvolvidos em cativeiro são mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções bacterianas. Segundo SOULAP, 1999, infecções múltiplas podem ser causadas por patógenos como *Rickettsia*, *Vibrio sp.*, *Salmonella*, *Listeria*, etc.

sendo ocasionadas pelo consumo de fezes, levando a grandes mortalidades em larviculturas.

Vários autores confirmam o uso benéfico de microrganismos probióticos aplicados na aquicultura; VILLAMIL *et al.*, (2002), determinaram a influência de bactérias lácticas na inibição de *Vibrio alginolyticus*, adicionando em *Artemia salina*, *Lactobacillus brevis* ( $1 \times 10^8$  bactérias/ mL), coincidindo com os resultados obtidos *in vitro*; indicando que a redução bacteriana pode ser causada pelo sinêgismo de vários compostos produzidos, como os exopolissacarídeos das bactérias lácticas, e não pela produção de ácido láctico. Considerando em seu estudo que a capacidade de crescimento e sobrevivência dos organismos cultivados por períodos prolongados, são claramente efetivos quando se controla os microrganismos indesejáveis.

RENGPIPAT *et al.*, 1999 testaram o *Bacillus* S11, considerado como probiótico, em crescimento larval de camarões peneidos encontrando diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o grupo controle; em ensaios de desafio com *V. harveyi*, o grupo tratado com probióticos apresentou 100% de sobrevivência frente ao 26% do grupo controle. Nas provas histopatológicas, o grupo controle apresentou sinais claros de infecção, sendo que o grupo tratado com probiótico, não apresentou sintomatologias aparentes.

ROBERTSON *et al.*, 2000, isolaram uma cepa probiótica do intestino do Salmão, caracterizada como *Carnobacterium* sp. Estudos *in vitro* demonstraram antagonismo frente a 12 microrganismos patógenos entre eles *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium psychrophila*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*. Para ensaios de desafio, foram preparados alimentos contendo o probiótico e administrado na alimentação por 14 dias; a partir do 4º dia foram reisoladas as bactérias probióticas do intestino, verificando colonização e após os 14 dias, se efetuaram desafios com *A. salmonicida*, *V. ordalli*, e *V. ruckeri*, indicando uma efetiva redução das infecções causadas por estes microrganismos.

Estes estudos demonstram a efetividade do uso de microrganismos probióticos na aquicultura, indicando que o controle de doenças precisa de uma nova abordagem que seja efetiva e ambientalmente segura. A interação de

microrganismos, animais e seus ambientes numa produção de escala comercial, deve ser gerenciada com cautela. O uso de bactérias benéficas (probióticas) para inibir patógenos através de processos naturais, é um meio mais seguro e efetivo do que o uso de antibióticos para promover a saúde animal. O controle de patógenos com probióticos nos cultivos de camarão tem um potencial considerável (GARCÍA e MASSAM, 2005).

Neste estudo foram isoladas, caracterizadas e selecionadas cepas de bactérias lácticas de intestinos de peixe e camarão, com características probióticas para elaboração de inóculos subministrados na alimentação de larvas e camarões juvenis, com o propósito de substituir antibióticos, prevenir doenças, estimular o sistema imune, além de melhorar a qualidade da água do cultivo.

## **2 OBJETIVO GERAL**

O principal objetivo deste estudo se fundamentou na necessidade da substituição dos antibióticos na carcinicultura, mediante a procura de microrganismos com características probióticas que permitissem o controle de doenças comuns em camarões marinhos de cultivo, ocasionadas por microrganismos patogênicos, além de proporcionar um fortalecimento do sistema imune.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar, selecionar e caracterizar cepas de microrganismos lácticos com características probióticas para evitar o uso de antibióticos na carcinicultura.
- Efetuar estudos de cinética de crescimento em diferentes meios de cultura para um melhor desenvolvimento dos microrganismos e produção de inóculos comerciais.
- Estudar o método mais efetivo de aplicação para colonização massiva e rápida dos microrganismos nos animais a serem tratados.
- Verificar sobrevivência das bactérias probióticas na passagem pelo trato digestivo, mediante administração de alimento incorporando probióticos.



- Efetuar ensaios *in vivo* mediante desafios com patógenos para verificar a sobrevivência e sintomatologia dos animais tratados com as cepas probióticas adicionadas na água.
- Avaliação da resposta imune com ensaios *in vivo* em camarões desafiados com patógenos e tratados previamente com probióticos incluídos na alimentação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CULTIVO DE CAMARÕES MARINHOS NO BRASIL

A carcinicultura foi introduzida no Brasil na década dos 70 (de PAIVA ROCHA, 2003), entretanto a prática do cultivo de camarão se tornou lucrativa nos anos 80 com a espécie exótica *Penaeus japonicus*. Perante a inaptidão do *P. japonicus* em termos empresariais somente teve início nos anos 80, com o uso da espécie exótica *Panaeus japonicus*. Devido à inaptabilidade do *P. japonicus* às baixas salinidades, a carcinicultura brasileira redirecionou seus objetivos para as espécies nativas, *P. schmitti*, *P. brasiliensis* e *P. pauliensis*. Porém, de acordo com (SOULAP, 1999), a baixa produtividade e a pouca lucratividade dessas espécies nativas provocaram a desativação e a reconversão a salinas de diversas fazendas na região Nordeste, sendo reduzida à área de cultivo no Rio Grande do Norte de 1000 ha para menos de 100 hectares. A carcinicultura teve reinício em 1993, a partir do biênio 95/96, coincidindo a com a escolha do *Litopenaeus vannamei*, espécie que se adaptou melhor ao cultivo em viveiros, com boa sobrevivência e adaptação à baixa salinidade procedente do Equador, sendo a principal espécie da carcinicultura brasileira.

Com o domínio do conhecimento do ciclo reprodutivo e a auto-suficiência na produção de náuplios e pós-larvas do *L. vannamei*, vários países latino americanos passaram a utilizar uma tecnologia desenvolvida para essa espécie, o que contribuiu para um expressivo crescimento do camarão cultivado nos anos subseqüentes (de PAIVA ROCHA, 2003).

Em 2003 foram produzidas no Brasil 90,2 mil toneladas de camarão marinho cultivado, das quais foram exportados US\$225,9 milhões (FAHENIA, 2004).

Estas condições projetam a carcinicultura marinha ao mercado externo, cujas condições de demanda e preço são altamente favoráveis, com um potencial importante de geração de divisas. (Min. da Agricultura e Abastecimento, 2004).

### 3.2 ENFERMIDADES NO CULTIVO DE CAMARÃO MARINHO

Na carcinicultura, enfermidade significa qualquer alteração adversa na saúde ou no desempenho de camarões ou populações de camarões cultivados. As enfermidades são desencadeadas quando ocorre um desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões cultivados e os agentes potencialmente patogênicos. As enfermidades infecciosas são causadas por patógenos transmissíveis (vírus, bactérias, protozoários e fungos), enquanto as não infecciosas são resultantes de agentes abióticos (efeitos nutricionais, genéticos, ambientais e físicos). Sob situação de desequilíbrio no ambiente de cultivo, os camarões são submetidos a uma condição de estresse, gerando uma alteração em seu estado imunológico. Nestas circunstâncias a população cultivada pode sofrer um ataque de patógenos levando os indivíduos a debilitação ou morte.

Inúmeros fatores ambientais podem desencadear um processo infeccioso nos camarões marinhos. Temperaturas e pH extremos, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mudanças abruptas na salinidade e presença de substâncias tóxicas, são elementos associados ao desequilíbrio no ambiente. A propagação de bactérias patogênicas oportunistas (*Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., etc.), a proliferação de protozoários (*Zoothamnium* spp. e gregarinas), a captação de água contaminada, a aquisição de pós-larvas com elevada carga viral e a presença excessiva de outros contaminantes (dinoflagelados e cianofíceas) também geram patogenia nos camarões (SOULAP, 1999).

As enfermidades na carcinicultura são classificadas sob três níveis, baseando-se no nível de patogenicidade e risco para a indústria do camarão, sendo que a categoria C3 envolve os patógenos que causam um mínimo de impacto à produção, contudo podem gerar deformidades e alterações na aparência física dos camarões. Na categoria C2 estão os patógenos que causam ameaça à produção, podendo afetar a produtividade dos cultivos o crescimento e a sobrevivência dos camarões. A categoria C1 inclui os patógenos que causam mortalidade em massa em populações, representando uma ameaça à sobrevivência da indústria em uma determinada área geográfica. É nesta categoria que se encontram a maioria das doenças virais e bacterianas dos camarões marinhos (LIGHTER, 1998; NUNEZ e MARTINS, 2002).

Dentro das doenças mais comuns e importantes no cultivo de camarão marinho podem-se mencionar:

### 3.2.1 IHHNV (Infecção viral na hipoderme e necrose do tecido hematopoiético)

O IHHNV é classificado como um vírus da categoria C1. Foi inicialmente observado em 1980 no Havaí, em populações cultivadas do *Litopenaeus stylirostris*. O IHHNV apresenta como principais sinais clínicos deformidades no rosto, flagelo antenal enrugado, deformidades cuticulares e taxa de crescimento reduzida. No *Litopenaeus vannamei*, o IHHNV pode se manifestar através de animais nanicos com deformidade ao longo do corpo (RDS “Runt Deformity Syndrome”). A transmissão do IHHNV pode ser vertical, durante o desenvolvimento embrionário, ou horizontal, através da ingestão de tecido infectado com o vírus e contato com água ou equipamentos contaminados. Não existe tratamento disponível para erradicação do IHHNV. Seu controle se dá através da aquisição de pós-larvas de boa procedência. Têm sido encontrado no Brasil (LIGHTER, 1998; SOULAP, 1999; NUNES e MARTINS, 2002).

### 3.2.2 Vírus da síndrome de Taura (TSV)

Desde 1992 o TSV têm sido encontrado presente em fazendas de camarões marinhos do Equador. Inicialmente especulava-se a implicação de fungicidas e pesticidas utilizados em plantações de banana como causadores da enfermidade. Em 1994 um vírus foi identificado como agente causador da síndrome. O TSV foi o responsável pelo colapso da indústria equatoriana em 1993. Este vírus causa na fase aguda de infecção, o aparecimento de camarões avermelhados em função da expansão dos cromatóforos. Os camarões não completam o processo de muda, morrendo com o exoesqueleto ainda mole. Quando vivos, os animais apresentam um comportamento letárgico e não se alimentam.

Na fase aguda as mortalidades podem alcançar 25%, restando no final entre 5% e 25% de sobreviventes. Na fase crônica da doença, os camarões conseguem sobreviver à muda podendo apresentar comportamento ativo e alimentação normal. Neste estágio, os indivíduos infectados apresentam lesões e melanizações na cutícula, podendo sucumbir nos ciclos de muda subseqüentes. Algumas vezes apresentam cutícula mole e expansão avermelhada dos cromatóforos. A transmissão e o controle são semelhantes ao IHHNV. Está presente no Brasil (LIGHTER, 1998; SOULAP, 1999; NUNEZ e MARTINS, 2002).

### 3.2.3 Vírus da mancha branca (WSSV)

Os primeiros relatos da ocorrência do WSSV estão entre os anos de 1992 e 1993 em países do nordeste asiático. Em 1999 foi detectada a ocorrência do WSSV em diferentes países de América Central, inicialmente em Honduras e na Nicarágua e em seguida no Panamá e Equador.

O diagnóstico do WSSV para as espécies asiáticas baseia-se em sinais macroscópicos, como a presença de manchas brancas cuticulares sobre o exoesqueleto. Estas manchas podem ser facilmente observadas a olho nu em casos mais avançados sendo mais evidentes no *Penaeus monodon* devido a sua coloração escura. As manchas são formadas por depósitos excessivos de sais de

cálcio na epiderme cuticular. No *Litopenaeus vannamei*, o aparecimento de manchas brancas cuticulares pode não ocorrer ou não ser detectado facilmente.

Os sinais da mancha branca não se manifestam até os estágios de PL20 – PL21. Os principais sinais da infecção são: (a) camarões letárgicos, exibindo um nado lento na superfície; (b) baixo consumo alimentar; (c) corpo com uma coloração rosada a pardo-avermelhado; (d) cauda vermelha associada à expansão de cromatóforos (condição similar aquela causada pelo TSV; (e) mortalidade de 100% nos primeiros 3 a 10 dias após a exibição dos sinais clínicos ; (f) morte dos camarões no fundo dos viveiros, e (g) manchas brancas de 0,5 mm a 2,0 mm de diâmetro na superfície do exoesqueleto, resultantes do depósito anormal de sais de cálcio. Em 2004, o Brasil exibiu os primeiros casos de sintomatologia e enfermidade seguida de elevadas mortalidades, com posterior diagnóstico molecular positivo ( LIGHTNER, 1998; MALDONADO *et al.*, 2004; PANORAMA AQUICOLA, 2005).

#### 3.2.4 Hepatopancreatite necrosante (NHP)

A NHP é causada por bactérias Gram-negativas, que atacam o hepatopâncreas. Inicialmente os camarões afetados pela NHP podem não apresentar um quadro clínico sem sinais evidentes (assintomático). Em seguida os camarões cessam a alimentação e o crescimento, exibindo um exoesqueleto amolecido. O trato digestivo apresenta-se sempre vazio, com brânquias descoloradas e visíveis alterações no hepatopâncreas (esbranquiçado, reduzido e com túbulos lesionados). As mortalidades acumuladas podem alcançar 50%.

JUAREZ (1997) e PANTOJA (1997), sugerem que condições letais como a síndrome da Zoea, que induz as células hepatopancreáticas a se separarem e atrofiarem causando a desintegração do epitélio intestinal, estão associadas a um contato com bactérias patógenas em estágios iniciais de desenvolvimento. O NHP aparentemente não ocorre em salinidades inferiores a 10 ppt. É recomendada a implementação de métodos de detecção precoce e monitoramento contínuo do estoque cultivado para evitar e controlar o NHP.

### 3.2.5 Vibrioses

Surtos de vibrioses são geralmente causados por desequilíbrio na população das bactérias do gênero *Vibrio* que se encontram naturalmente nos ecossistemas estuarino e marinho. Entre as principais espécies do gênero que causam maiores prejuízos estão o *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*.

As vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, atacando todos os estágios de vida do camarão (larval, pós-larval, juvenil e adulta). Problemas com vibriose ocorrem quando há condições de estresse no sistema de cultivo, tais como: (a) diminuição de oxigênio; (b) densidade de estocagem excessiva; (c) manuseio inapropriado do estoque; (d) lesões na cutícula dos camarões; (e) subalimentação, e (f) altas concentrações de compostos nitrogenados no ambiente de cultivo (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2001).

O processo de infecção da vibriose pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e ou abscessos pontuais no hepatopâncreas. O impacto da vibriose é variável, mas em alguns casos pode alcançar até 70% da população cultivada. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem ser canibalizados, rapidamente contaminando outros indivíduos na população (LIGHTNER, 1998; SAULNIER *et al.*, 2000).

Os camarões infectados internamente por vibrios apresentam sinais característicos quando estão próximos à morte; tais sinais incluem: (a) fraqueza (os camarões se deitam no fundo do viveiro); (b) nado desorientado; (c) opacidade da musculatura abdominal; (d) aumento da pigmentação; (e) grampo na cauda, e (f) lesões escuras ou amarronzadas na cutícula. A ocorrência de vibriose é comum em fazendas de camarão no Brasil (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2005).

O *Vibrio harveyi* é conhecido por ser o patógeno que mais doenças ocasiona em *Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon*. Estudos efetuados por

LAVILLA-PITOGO e de la PEÑA (1998) indicam que infecções causadas por vibrios em sistemas de cultivo são mais devastadoras devido à fragilidade das larvas, reportando massivas perdas em culturas de camarão nas Philipinas. De acordo com estes autores, o decréscimo foi de 60% entre 1992 e 1994, associada a vibrios luminiscentes, sendo recomendada a suspensão da produção nas fazendas até eliminação dos vibrios. AGUIRRE-GUZMÁN et al., (2004) reportaram que diferentes espécies de vibrios são consideradas patogênicas oportunistas, ocasionando grandes perdas na produção de camarão com mortalidades até de 100%, especialmente em pós-larvas e juvenis.

Diferentes produtos extracelulares (ECP) com efeitos tóxicos em camarão foram caracterizados de diferentes espécies de *Vibrio* isoladas de organismos marinhos e de meio ambiente. Estes ECP mostraram ser tóxicos para camarão e outras espécies marinhas. Produtos extracelulares como quitinases, hemolisinas, proteases alcalinas, cisteína protease, serina proteases e metaloproteases foram isoladas de sobrenadantes de culturas de *V. harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. anguillarum*. Produtos extracelulares de cultura de *V. penaeicida* incubados a 20° C, ocasionaram 100% de mortalidade quando injetados em camarões juvenis de *L. stylirostris* (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004).

Extrato cru do ECP parcialmente purificado da exotoxina protease de *V. alginolyticus* foi letal para camarões juvenis de *M. japonicus* (LD<sub>50</sub> 0.3 e 0,27 µg proteína g<sup>-1</sup>). Esta exotoxina foi uma serine protease neutra (33 kDa) (LEE et al., 1997; CHEN e LEE, 1999). Estes fatores de patogenicidade e outras relações com moléculas produzidas por estes microrganismos, podem nos ajudar a entender os mecanismos de patogenicidade das cepas de *Vibrio*.

Por outro lado alguns vibrios isolados de aquicultura apresentam resistência aos mais comuns antibióticos empregados para o controle de doenças tais como a enrofloxacin, florfenicol, trimethoprima, e oxitetraciclina, indicando que a administração destes antimicrobianos podem fortalecer a resistência de espécies que causam doença em humanos e animais (TEO et al., 2002).

### 3.3 RESPOSTA IMUNE EM CRUSTÁCEOS

Nos invertebrados a resposta imune se apresenta em duas fases: uma imediata não induzível associada à efetores celulares, e uma fase induzida humoral caracterizada pela participação das proteínas plasmáticas e fatores microbicidas circulantes que melhoram a eficiência da resposta imune (THÖRNQVIST e SÖDERHÄLL, 1997).

Nos crustáceos os mecanismos celulares envolvem diretamente os hemócitos. Existem 3 tipos de hemócitos caracterizados de acordo com a sua morfologia; hialinos, com controle da fagocitose e coagulação; semigranulosos, vinculados aos processos de fagocitose, encapsulação e nodulação e granulosos que contem as enzimas que formam parte do sistema fenoloxidase (RODRIGUEZ e LE MOULLAC, 2000).

A fagocitose é a reação mais comum de defesa celular. Durante este processo, partículas de microrganismos são internalizadas dentro das células num vacúolo digestivo chamado fagossoma. A eliminação das partículas fagocitadas implica na intervenção de enzimas dentro do fagossoma e geração de radicais de oxigênio (Bachère *et al.*, 1995). Este processo destrutivo é conhecido como choque respiratório e conduz a ativação da enzima de membrana NADPH oxidase, que cataliza a redução parcial do oxigênio em ânion superóxido ( $O_2^-$ ). A partir daí, ocorrem várias reações celulares que levam a produção de peróxido de hidrogênio e radicais hidróxido (MUÑOZ *et al.*, 2000).

A pro-fenoloxidase (proPo) é uma enzima que se encontra no interior dos hemócitos granulares. Por estimulação de componentes da parede celular dos microorganismos, a proPO se libera e se ativa em fenoloxidase. Esta enzima é a chave da síntese de melanina e está presente nos pontos de inflamação dos crustáceos (JOHANSSON e SÖDERHÄLL, 1989).

O sistema fenoloxidase promove a hidroxilação de fenóis e oxidação de fenóis a quinoses, os quais são responsáveis por destruir qualquer partícula estranha que invada a hemolinfa durante o processo de recuperação de feridas.



As quinolonas são subseqüentemente polimerizadas em melanina por reações enzimáticas (BARRACO, 2004).

Recentemente a caracterização de uma nova família de peptídios antimicrobianos "peneidinas" foram isolados da hemolinfa de *L. vannamei*. As peneidinas atuam na eliminação de microrganismos durante a fagocitose, atuando como antibióticos endógenos (DEUTOMIEX *et al.*, 1997).

O sistema imune dos invertebrados é caracterizado pela carência de mecanismos adaptativos como anticorpos; razão pela qual é impossível a aplicação de vacinas. Não entanto, recentemente foi reportada evidência de memória adaptativa em crustáceos (KURTZ e FRANZ, 2003).

Investigações da resposta inata do sistema imune em crustáceos têm mostrado novas perspectivas no controle de doenças em aquicultura, principalmente com os peptídeos antimicrobianos para ser usados como agentes terapêuticos proporcionando resistência a infecções (BACHÈRE, 2002, 2003).

### 3.4 USO DE ANTIBIÓTICOS EM CULTIVO DE CAMARÃO

Os problemas bacteriológicos especialmente os causados por *Vibrio spp.*, constituem uma das principais causas de mortalidade em laboratórios e fazendas camaroneiras. O procedimento normalmente utilizado para controlar seus efeitos e diminuir sua incidência, está centralizado no uso de antibióticos os quais, são empregados em forma e dosagem inadequada, gerando assim o surgimento de cepas resistentes e cada vez mais patogênicas (VALLE *et al.*, 2002).

O uso de antibióticos em alimentos para animais é preocupante, devido à transferência da resistência aos antibióticos na bactéria associada ao animal para patógenos humanos. Embora o tratamento com antibióticos seja de alguma maneira o mais rápido a responder às doenças bacterianas na aquicultura, ele também pode ser contraproducente, já que os antibióticos podem causar um aumento na resistência dos patógenos. Novos patógenos surgiram ao longo do tempo e, em resposta ao uso de antibióticos, muitos destes patógenos se tornaram mais resistentes do que os patógenos do camarão o que ocasiona um aumento da mortalidade na carcinicultura (AQUALIDER, 2003).

O surgimento de enfermidades tem aumentado sensivelmente, sendo reconhecido como fator limitante na aquicultura e comércio, afetando o desenvolvimento do setor econômico de muitos países. Na indústria do camarão de cultivo é o maior fator limitante (LINK, 1995; SUBASINGHE, 1997; HARPER, 2002).

O uso de desinfetantes e drogas antimicrobianas tem limitado o sucesso na prevenção ou cura de enfermidades aquáticas. O uso massivo de antimicrobianos para o controle de doenças infecciosas e promotores de crescimento em animais, exerceram uma pressão seletiva nos microrganismos, favorecendo a aparição de microrganismos resistentes (KÜMMERER, 2004).

Estudos efetuados por HAMEED et al., (2003) evidenciaram a resistência a antibióticos como oxitetraciclina, furazolidona, eritromicina e cloranfenicol em 523 cepas isoladas de camarões em viveiros de aquicultura.

Só dois antibióticos foram aprovados para uso na aquicultura pelo FDA e Centro de Medicina Veterinária (CVM) e avaliados na indústria de aquicultura doméstica: Oxytetraciclina e Ormetropim: Sulfadimethoxine (Mac MILLAN *et al.*, 2004). Cloranfenicol e nitrofuranos, são antibióticos de amplo espectro utilizados em camarões de cultivo, que apresentam uma alta taxa de risco de toxicidade para seres humanos. O cloranfenicol pode causar doenças potencialmente fatais como anemia e leucemia, enquanto que os nitrofuranos são carcinogênicos.

O uso destes antibióticos na produção de alimentos é proibido há pelo menos uma década na maioria dos países. Pesquisas com ratos têm mostrado que a exposição aumenta o risco de câncer em um para cada milhão de indivíduos quando a exposição é por toda a vida de 1-5µg/kg/dia.

Em estudo similar, a furazolidona aumentou o risco de câncer em um para cada um milhão de indivíduos quando a exposição por toda a vida foi de 100 ng/kg/dia. Supondo um consumo médio de furazolidona semanal de 8,4 kg, um nível de contaminação de furazolidona de 22 µg/kg, e um peso corporal do consumidor de 65 kg, a exposição a furazolidona seria de 0,4 ng/kg/dia. Isto equivale a 250 vezes menos que a dose projetada para aumentar o risco de

câncer em um para cada milhão de indivíduos (AMORNCHAI, 2002; MERCADO & PESCA, 2002).

Na Ásia, o cloranfenicol foi usado extensamente como antibiótico na aquicultura apesar dos controles em muitos países. Após a detecção de resíduos de cloranfenicol nos produtos de camarão exportados da Ásia para os EUA, desde setembro de 2001, é praticado um exame rigoroso. De acordo com USFDA (The United States Food and Drug Administration) antibióticos de uso humano e o cloranfenicol, são colocados na lista das substâncias proibidas para uso em animais que serão parte de consumo alimentar. A lista de drogas proibidas inclui também o furazolidona e a nitrofurazolidona. O cloranfenicol está entre as substâncias ativas de farmacologia das quais não é permitido nenhum nível máximo residual (AMORNCHAI, 2002).

Por toda Ásia e América Latina as fazendas de camarão utilizam antibióticos em grande quantidade, incluindo fluoroquinolonas como a sarafloxacin e enrofloxacin. É difícil determinar o uso total anual, mas uma estimativa conservadora está entre a faixa de 1.000 – 2.000 toneladas métricas (tm) ano (AQUALIDER, 2003; MORIARTY, 1999).

Em estudos realizados nos EUA. pelo Instituto para Uso de Antibióticos, estima-se que 204.000 a 433.000 libras de antibióticos estão sendo usadas anualmente na produção de rações formuladas para alimentação na aquicultura, sendo os mesmos antibióticos utilizados no tratamento de doenças humanas (FOOD AND ENVIRONMENT, 2003).

#### 3.4.1 Resistência no meio ambiente

Deve-se considerar um outro aspecto importante relacionado com a cultura de camarão e o uso de antibióticos, o resíduo de antibióticos no camarão, e no meio ambiente. A maior preocupação em relação ao uso de agentes antibacterianos em aquicultura, é a possibilidade de que seus resíduos possam estimular a resistência bacteriana. As primeiras pesquisas de residualidade concluem que a maior parte dessas drogas é ligada a diferentes partículas e ao sedimento em tanques e viveiros. O impacto residual dos antibióticos sobre a

comunidade bacteriana também tem sido avaliado já que a presença destes agentes antimicrobianos em baixas concentrações em fazendas de cultivo de camarão leva ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes ao agente (MONTTOYA *et al.*, 2003).

Muitos dos compostos utilizados na aquicultura não são metabolizados e são descarregados diretamente na água sem prévio tratamento, tendo conseqüências diretas no meio ambiente (KÜMMERER, 2004). Os agentes antimicrobianos usados no tratamento de doenças nos animais são descartados diretamente na água resultando uma grande concentração, além dos sedimentos que vão se formando. Muitos dos antibióticos e produtos desinfetantes não são totalmente eliminados nos processos de purificação; existe um bom número de antibióticos e desinfetantes indicados como não biodegradáveis no meio aquático (AL-AHMAD *et al.* 1999; KÜMMERER *et al.*, 2000).

Têm sido encontrados um bom número de bactérias resistentes devido à aplicação de antibióticos em aquicultura presentes em sedimentos em concentrações o suficientemente potentes para inibir o crescimento de bactérias; as substâncias antibióticas utilizadas na aquicultura podem se sedimentar atingindo concentrações críticas (NYGAARD *et al.* 1992; ANDERSEN *et al.*, 1994).

Atualmente no Brasil o cultivo de camarão em cativeiro é criticado por ambientalistas; embora seja uma das atividades mais lucrativas do Ceará, a criação de camarão em cativeiro é motivo de polêmica sobre os danos que a atividade pode causar no meio ambiente. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis (IBAMA) fez um diagnóstico da carcinicultura no estado, onde estariam incluídos entre outros o tema dos antibióticos na aquicultura (MERCADO & PESCA, 2004).

### 3.4.2 Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos

Conhece-se por resistência bacteriana um conjunto de mecanismos pelos quais microrganismos tornam-se imunes a um ou mais antibióticos (CHIQUELLO e MONTIANI, 1997). Não somente podem tornar-se resistentes após serem tratados

com antibióticos, como também transferir genes de resistência a outras bactérias que não foram expostas ao antibiótico.

O uso de antibióticos da medicina humana na agricultura e cultivo de animais, permitiram o desenvolvimento de resistência cruzada, causando um particular perigo para a saúde humana (VERSCHUERE *et al.*, 2000). De outro modo 70% dos antibióticos e drogas relacionadas são usadas para finalidades não terapêuticas como aderacao do crescimento animal (promotoras de crescimento); o que corresponde a cerca de 25 milhões de libras de antibióticos e drogas relacionadas, utilizadas na alimentação de animais domésticos (BENBROOK, 2001).

### 3.4.3 Bases genéticas da resistência bacteriana

O genoma bacteriano está organizado em plasmídeos (cadeias circulares de DNA extracromossomal capazes de duplicação autônoma) e cromossomos (STRYER,1992; CHAMBERS e SANDE,1996). As informações necessárias para a resistência de antibióticos podem estar registradas tanto nos plasmídeos (STRYER,1992) como nos cromossomos (MANDELL e PETRI,1996). As informações para resistência podem, transferir-se de um ponto a outro do genoma se forem codificadas por transpósons, que são cadeias de DNA com seqüências de inserção em suas terminações. Os transpósons podem ser transferidos de uma bactéria para outra por vírus bacteriófagos. Em alguns casos, o vírus vetor não consegue sobreviver na nova bactéria hospedeira . Aí o transpósons consegue se salvar desligando-se do DNA viral e integrando-se ao genoma bacteriano (STRYER, 1992; CHAMBERS e SANDE, 1996).

### 3.4.4 Resistência intrínseca

Este tipo de resistência é inerente à bactéria, e não adquirido. As bactérias Gram negativas são notoriamente resistentes a antibióticos hidrofóbicos que não conseguem atravessar uma membrana externa. Os antibióticos hidrofílicos conseguem atravessar a membrana por meio dos canais formados pelas porinas

(MANDELL e PETRI, 1996). A *Pseudomona aeruginosa* resiste a muitos antibióticos hidrofílicos por que suas porinas são muito estreitas (CHOPRA, 1984). Por outro lado as bactérias são resistentes à droga que produzem (CUNDLIFFE, 1984).

#### 3.4.5 Resistência adquirida

Bactérias originalmente suscetíveis a um antibiótico podem adquirir resistência a ele por diversas maneiras .

Mutação: esta é a primeira forma de aquisição de resistência; consiste na ocorrência de uma mutação genética estável e transmissível à descendência. Tais mutações ocorrem com relativa frequência em grandes populações bacterianas (CHAMBERS e SANDE, 1996).

Conjugação: Tal processo ocorre principalmente em bactérias Gram negativas e algumas Gram positivas. Consiste na passagem de material genético de uma bactéria F+ (macho) através de um *pilus* de contato para uma bactéria F- (fêmea), que após isso se tornara F+ (STRYER, 1992).

Transdução: Os vírus bacteriófagos também têm um importante papel na transmissão da resistência bacteriana. Quando um fago infecta uma bactéria, deve entrar no ciclo lítico (se for um fago virulento) ou integrar-se no genoma bacteriano como profago (se for um fago temperado). Neste caso, ele se replicará em sincronia com o cromossomo hospedeiro. Quando o profago for liberado do cromossomo hospedeiro, entrará no ciclo lítico. Mas seu material genético levará algumas informações anteriormente contidas no DNA bacteriano (STRYER, 1992). Quando os novos fagos temperados infectarem outras bactérias, eles lhes transmitirão as informações roubadas à bactéria de origem (STRYER, 1992; CHAMBERS e SANDE, 1996).

#### 3.4.6 Mecanismos bioquímicos de resistência

Há vários mecanismos de resistência a antibióticos como:

Inativação enzimática: O exemplo clássico é a inativação dos antibióticos beta-lactâmicos pela beta-lactamases (muitas delas codificadas por plasmídeos). O cloranfenicol é inativado pela cloranfenicol acetiltransferase. Os aminoglicosídeos podem ser fosforilados, adenilados ou cetilados por enzimas bacterianas específicas, (também codificadas por plasmídeos) (MANDELL e PETRI, 1996).

Alteração estrutural do alvo do antibiótico: Quando as proteínas responsáveis pela integridade da parede celular da bactéria são alteradas por baixa afinidade pelo antibiótico, impede a ação do mesmo. Mudanças na estrutura dos ribossomos reduzem sua afinidade por cloranfenicol ou aminoglicosídeos. A exposição de *E. coli* à rifampicina origina (por mutação) bactérias altamente resistentes, alterando a RNA polimerase das mesmas e impedindo a ligação do antibiótico. Do mesmo modo, alterações estruturais da girase conferem resistência a quinolonas; alterações da dihidropteroato sintase impedem a ação das sulfas (CHAMBERS e SANDE, 1996; MANDELL e PETRI, 1996).

Resistência cruzada: A resistência a um antibiótico implica automaticamente na resistência a outro em geral estruturalmente relacionado. Vários antibióticos são conhecidos pela capacidade de gerar ou não resistência cruzada. Várias enzimas que inativam a gentamicina podem atacar a trobramicina, amicacina e netilmicina (mas não a estreptomicina). A exposição da *E. coli faecium* com fenótipo Van B à vancomicina pode induzir resistência contra esse antibiótico; no entanto se a bactéria tiver o fenótipo Van A ela se tornará resistente também contra a teicoplanina (MANDELL e PETRI, 1996).

### 3.5 USO DE PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS NA AQUÍCULTURA

As enfermidades bacterianas são consideradas como a maior causa de mortalidade em larvas de camarão de cultivo. Devem ser conduzidos ainda muitos estudos para obter uma significativa redução na mortalidade (GÓMEZ-GIL, 2000).

É necessário na aquicultura o desenvolvimento de estratégias para o controle de microrganismos patogênicos, responsáveis por surtos de

enfermidades, considerados como um limitante no desenvolvimento da indústria aquícola, além de evitar o desenvolvimento de resistência a antibióticos. Uma das alternativas de controle microbiano para estas enfermidades é o uso de bactérias consideradas probióticas como agentes de controle.

GOMEZ-GIL. (2000) e GARCIA *et al.*, (2003), sinalam como estratégia alternativa para o tratamento de enfermidades, o uso de microrganismos probióticos em sistemas de aquícultura com efeitos benéficos para o hospedeiro tais como incremento na taxa de crescimento, resistência a enfermidades e inibição de crescimento de microrganismos patogênicos.

O uso de medicamentos e elementos químicos como os antibióticos são recursos que pelas implicações negativas inerentes na saúde humana e meio ambiente, ficaram relegados como prática comum na aquícultura. A procura de estratégias alternativas na prevenção ou erradicação das enfermidades inclui agora os temas como aplicação de vacinas por indivíduo, estimulação do sistema imune dos animais pela inclusão dietética de alguns aminoácidos e o uso de microrganismos benéficos melhor conhecidos como probióticos (MORIATY, 1999; VERSCHUERE *et al.*, 2000; DOYLE, 2001; HOROWITZ e HOROWITZ, 2002; GARCIA *et al.*, 2003; CENAIM, 2004).

### 3.5.1 Definição de microrganismos probióticos

O termo *probiótico* é derivado do grego que significa “para a vida”. Os primeiros a usar o termo foram LILLY e STILLWEL (1965) ao descrever “substâncias de certos microrganismos as quais estimulavam o crescimento” contrastando com o termo *antibiótico*. Segundo HAVENAR e HUIS IN’T VELD (1992) é definido como probiótico “a *preparação de uma substância contendo microrganismos viáveis em número importante, a qual pode alterar a microflora por implantação ou colonização no hospede, trazendo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro*”.

São considerados como probióticos, microrganismos vivos utilizados como suplemento das dietas, os quais trazem benefício à saúde do consumidor influenciando o balanço intestinal microbiano. *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são



espécies de microrganismos tidos em conta como probióticos de interesse, considerando que uma população importante destas bactérias no trato intestinal é geralmente considerada como indicativo de microbiota saudável (FULLER, 1992; CRITTENDEN *et al.*, 2001; SHAH, 2001). O conceito probiótico surgiu a partir das observações de Metchnikoff em 1907, e de estudos de exclusão competitiva efetuados por NURMI e RANTALA (1973) baseados nas observações das variações da flora intestinal, ocasionadas por fatores de estresse como temperatura, densidade de população, alimentação artificial e manuseio. Tais variáveis refletem na perda do apetite, surgimento de doenças e baixo crescimento (FOX, 1978; FULLER, 1989 e 1992).

Além das definições do conceito de probiótico e os efeitos produzidos pelos microrganismos viáveis, os quais são aplicáveis dependendo do sítio de ação e a via de administração, esta definição pode ser incluída em sítios como cavidade oral, vagina, intestino e pele (SCHREZENMEIR e VRESE, 2001). Nestas definições, os autores consideram somente a aplicação em humanos e animais terrestres. Estendendo a definição de probióticos na aquicultura, se sugere igualmente a adição de microrganismos vivos benéficos nos tanques ou viveiros nos quais se cultivam os animais, com a conseqüente modificação da composição dos sedimentos, eliminação de patógenos, melhorando a saúde dos animais, a qualidade da água, e incrementando a velocidade de degradação dos resíduos orgânicos (GATESOUBE, 1999; MORIATY, 1999; VERSCHUERE *et al.*, 2000).

### 3.5.2 Definição de probióticos em aquicultura

A definição de probióticos em aquicultura pode ser assumida considerando que a microbiota intestinal não existe como entidade, tanto pelas constantes interações do meio ambiente, quanto pelas funções no hospedeiro. Muitas pesquisas foram efetuadas relacionando microflora intestinal, ambiente aquático e alimentação. Resumindo, os resultados destas pesquisas em peixes, evidenciaram que as bactérias presentes no ambiente aquático influenciam a composição da microbiota intestinal e vice-versa. Os gêneros presentes no trato

intestinal são geralmente os mesmos do ambiente aquático ou os encontrados na dieta, os quais sobrevivem e se multiplicam no trato intestinal (CAHILL, 1990).

A frequência da interação hóspede-microrganismo é qualitativa como quantitativamente diferente para as espécies do meio ambiente aquático e terrestre. No meio ambiente aquático, hóspedes e microrganismos fazem parte do ecossistema, contrastando com o ecossistema terrestre. Os microrganismos no ambiente aquático vivem em associação com o potencial do hóspede (trato intestinal, brânquias ou pele). De outro modo, no ambiente terrestre a maior atividade microbiana está localizada no intestino do hóspede (HARRIS, 1993; VERSCHUERE, 2000).

Está estabelecido que as relações entre a microbiota, incluído probióticos e hóspedes, não somente está limitada ao trato intestinal. As bactérias probióticas podem ser ativas nas brânquias, pele, intestino como também no meio ambiente. A intensiva interação entre os microrganismos no meio ambiente em aquicultura implica que os probióticos são obtidos do meio ambiente. Neste caso, o termo probiótico em aquicultura pode ser definido como o microrganismo vivo adicionado para proporcionar um efeito benéfico ao hóspede, modificando a relação hóspede com a comunidade microbiana do meio ambiente o qual pode ser adicionado nos alimentos, elevando o valor nutricional, melhorando a resistência a enfermidades e melhorando a qualidade do meio ambiente (VERSCHUERE, 2000; GARCIA, 2003).

Baseado nesta definição, um probiótico pode ser adicionado com o propósito de prevenir o desenvolvimento de microrganismos patógenos que proliferam no trato intestinal, nas estruturas externas e no meio ambiente aquático onde são cultivados os animais (JORY, 1998; GARCIA, 2003).

O uso de bactérias probióticas com o propósito de eliminar patógenos por processos de competição, vem ocorrendo na indústria animal como alternativas na administração de antibióticos, e tem ganhado aceitação no controle de patógenos na aquicultura (AGUIRRE, 1992; MORIATY, 1999, LARA, 2002).

### 3.5.3 Bactérias lácticas como probióticos

As bactérias lácticas são os microrganismos probióticos mais importantes, tipicamente associados com o trato gastrointestinal dos humanos. Tradicionalmente as bactérias ácido lácticas têm sido classificadas de acordo com as características morfológicas e fenotípicas além do modo de fermentação da glicose, crescimento a diferentes temperaturas, configuração do isômero do ácido láctico e fermentação de vários carboidratos.

Estudos baseados na comparação seqüencial do RNA 16S ribossomal mostram que uma proporção gerada nas seqüências das bases fenotípicas não correspondem com o sugerido nas relações filogenéticas. Portanto, algumas espécies não podem ser identificadas pelas características fenotípicas. Conseqüentemente, técnicas moleculares modernas incluindo a reação baseada na cadeia polimerase e outros métodos genotípicos, são importantes métodos que facilitam a identificação de espécies para diferenciação de espécies probióticas. As cepas probióticas são selecionadas de acordo com as propriedades funcionais e fisiológicas particulares as quais podem ser determinadas *in vitro* (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

## 3.6 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

Características comuns são apresentadas pelas bactérias lácticas como: Gram positivas, imóveis, não esporuladas, cocos e bacilos, catalase negativa, e carência de citocromos (o que reflete na ausência de metabolismo respiratório gerador de energia), não liquidificam a gelatina e nem produzem sulfeto de hidrogênio.

Do ponto de vista morfológico, as bactérias lácticas podem estar distribuídas em cocos, bacilos ou bastões regulares e bacilos ou bastões irregulares. Os cocos são de forma esférica mais ou menos alargada entre 0,5 e 2 µm, se apresentam em pares, tétrades ou cadeias de número variado. Os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Enterococcus* estão dispostos em

pares ou cadeias, o gênero *Leuconostoc* forma células lenticulares dispostas em pares ou cadeias, os gêneros *Pediococcus* e *Tetragenococcus* formam células dispostas em tétrades (De ROISSART e LUQUET, 1994; HOLZAPFEL e WOOD, 1995; ALEXON, 1998).

Os bastões regulares podem ter um diâmetro variável entre 0.5 e 2  $\mu\text{m}$  e comprimento até maior que 10 $\mu\text{m}$ , se apresentados isolados, em pares ou cadeias longas. Os *Lactobacillus* pertencem a este grupo (AXELSSON, 1993; HAMES e VOGEL, 1995).

Os bastões irregulares são característicos das bactérias lácticas do gênero *Bifidobacterium* e são típicos por seus aspectos extremadamente variáveis de uma espécie a outra (DE ROISSART e LUQUET, 1994).

Possuem elevadas exigências nutricionais no substrato, metabolismo fermentativo estritamente sacarolítico, produzindo quase exclusivamente ácido láctico e em outras ocasiões ácido láctico e acético. Algumas cepas podem chegar a produzir ácido fórmico ou succínico. Nenhuma bactéria láctica é capaz de produzir ácidos voláteis com mais de dois átomos de carbono.

As bactérias lácticas podem sobreviver em presença de um pH relativamente baixo (3.5) de maneira diferente de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório (SMULDERS *et al.*, 1986). As bactérias lácticas possuem um sistema de transporte simultâneo de ácido láctico e de prótons ao exterior celular, que além de contribuir a homeostase do pH interno, originam energia (TSENG e MONTVILLE, 1993).

Outro fator de classificação das bactérias ácido lácticas é a diferença nas características fisiológicas e bioquímicas, as quais permitem a classificação dos diferentes gêneros que permitam o uso industrial. Em função disto, entre as características que se destacam para a classificação está a quantidade de ácido láctico produzido, temperaturas ótimas de crescimento, tolerância ao oxigênio e a diferentes concentrações de cloreto de sódio, capacidade de produzir gás, compostos aromáticos e voláteis, sensibilidade aos antibióticos e produção de bacteriocinas ou capacidade inibitória frente aos patógenos (KANDLER, 1990; SIMPSON e TAGUCHI, 1995). São também classificadas pela medição das

relações filogenéticas com seqüências de bases das frações 16S ou 23S de RNAr a qual permite uma classificação em grupos filogenéticos (SCHLEIFER *et al.*, 1991; HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

### 3.6.1 Fermentação ácido láctica

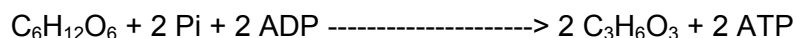
É uma reação derivada da energia na qual as bactérias ácido lácticas atuam como catalisadoras biológicas no processo de transformação de carboidratos em ácidos orgânicos e compostos protéicos (GILLILAND, 1990). As bactérias lácticas são caracterizadas pela produção de diferentes isômeros do ácido láctico mediante a fermentação da glicose. Durante a fermentação podem produzir ácido láctico L(+) dextrorotatório ou L(-) levorotatório ou a mistura de ambos DL (CARR *et al.*, 2001).

### 3.6.2 Homofermentação

É a principal rota de catabolismo da glicose, conhecida como glicólise ou via de Embden-Meyerhof-Parnas, onde um mol de glicose ou qualquer substrato glucosídico é degradado a dois moles de ácido láctico, sem oxigênio molecular. Consta de duas fases: na primeira a glicose é fosforilada por ATP e clivada para formar gliceraldeído fosfato. Na segunda, o gliceraldeído fosfato é convertido a ácido láctico numa série de reações de óxido-redução, que estão acopladas por meio de moléculas de NADH e NAD à fosforização do ADP para permitir a continuidade dos ciclos de fermentação subseqüentes (WILLET, 1989; AXELSSON, 1993).

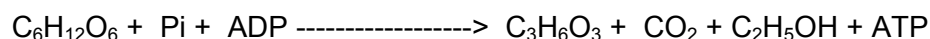
Quando a glicose como fonte de carbono no metabolismo produz 85% ou mais de ácido láctico, se considera um microrganismo homofermentativo (HAMMES e VOGEL, 1995). Esta via de fermentação é realizada por todos os membros do gênero: *Streptococcus*, *Pediococcus* e muitas espécies de *Lactobacillus* (CARR *et al.*, 2002). O piruvato é reduzido a ácido láctico por uma enzima lactato-desidrogenase, atuando o NADH como doador de hidrogênio. Nesta via são formadas quatro moléculas de ATP por cada molécula de glicose

fermentada, mas como são consumidas duas moléculas. A produção líquida é de duas moléculas de ATP por molécula de glicose fermentada, como se mostra na seguinte reação (WILLET, 1989; ALEXON, 1993).



### 3.6.3 Heterofermentação

Este tipo de fermentação ocorre pela via das pentoses-fosfato ou via de Dickens, é efetuada por alguns tipos de bactérias lácticas como *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus*. Caracteriza-se pela fermentação da glicose via pentose-fosfato e fermentada a ácido láctico em 50% e o resto, dióxido de carbono, álcool, ácido acético, fórmico, entre outros, paralelamente com duas moléculas de ATP e  $\text{NADH}_2\text{NAD}$  para permitir a continuação do processo de fermentação. A liberação do carbono um (C1) como dióxido de carbono é característica dos organismos heterofermentativos como se demonstra a continuação (WILLET, 1989; ALEXON, 1993; HAMMES e VOGEL, 1995).



### 3.6.4 Agentes inibidores

São substâncias antibacterianas de origem protéica ou química, altamente específicas, secretadas por uma determinada cepa ativa contra as outras cepas da mesma ou de outra espécie (DAESCHEL, 1989; FULLER, 1992).

As investigações iniciais sobre a estabilidade dos produtos fermentados confirmam que a acidificação provocada pela conversão de açúcares em ácidos orgânicos por bactérias lácticas é a principal responsável pela atividade microbiana. Tal atividade se deve ao efeito combinado da diminuição do pH e ao consumo de carboidratos, além da formação de ácidos orgânicos, principalmente láctico e acético. As bactérias lácticas produzem também outras substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, e diacetil e outros; Por outro lado foi

descrito que algumas espécies de bactérias lácticas são capazes de produzir e excretar substâncias antimicrobianas de natureza protéica chamadas bacteriocinas (TAGG *et al.*, 1976; REQUENA e PELAEZ, 1995).

#### 3.6.4.1 Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido de nomenclatura oficial: Ácido 2-hidroxiopropiônico, com peso molecular de 90,08 g/mol. É um cristal branco na forma sólida, com baixo ponto de fusão (33°C), de natureza higroscópica e altamente solúvel em água, álcool e outros solventes orgânicos (CHANAL, 1990). Contribui ao desenvolvimento do sabor, aroma e textura nos alimentos e também com sua estabilidade pela inibição de microrganismos alterantes. O mecanismo de inibição está baseado na dissociação dos ácidos orgânicos no meio, provocando um gradiente de prótons que excede a capacidade tamponante do citoplasma desequilibrando a bomba de prótons, ocasionando como consequência a desnaturação dos componentes estruturais ou o esgotamento das reservas energéticas da célula interferindo com sua viabilidade (REQUENA,1995).

#### 3.6.4.2 Peróxido de Hidrogênio

As bactérias lácticas produzem peróxido de hidrogênio como mecanismo de proteção frente ao oxigênio, pela ação das oxidases ou NADH peroxidases (CONDON,1987) o acúmulo de peróxido de hidrogênio nos produtos fermentados ocorre devido ao fato que os lactobacilos não possuem a enzima catalase (DAESCHEL,1989; REQUENA,1995). A ação bactericida deste composto é atribuída a seu efeito altamente oxidante, mediante a peroxidação dos lipídeos da membrana e a destruição da estrutura básica molecular das proteínas celulares (HAUGAARD, 1968; DAHL *et al.*, 1989).

#### 3.6.4.3 Diacetil

O diacetil é um composto produzido pelas bactérias lácticas que têm a capacidade de fermentar o citrato (REQUENA, 1995), além de ser o produto final do ciclo da fermentação butanodiólica, que ocorre num dos destinos do piruvato (DAESCHEL, 1989). O diacetil possui um efeito antimicrobiano a elevadas concentrações e pode ser metabolizado por alguns microrganismos.

Mesmo o diacetil é considerado uma substância segura, sua utilidade é reduzida por serem requeridas quantidades muito elevadas para exercer um efeito inibitório e por possuir um intenso aroma (LINDGREN e DOBROGOSZ, 1990).

#### 3.6.4.4 Bacteriocinas

As bacteriocinas são compostos protéicos que têm atividade letal contra outras bactérias. Normalmente as células bacterianas que produzem bacteriocinas são imunes à sua ação antagônica e propiciam à bactéria secretora uma vantagem competitiva sobre outras bactérias no mesmo ambiente ecológico. A secreção de bacteriocinas é encontrada amplamente no reino *Eubacteria* e têm ampla diversidade quanto as suas propriedades físicas e químicas (REQUENA e PELAEZ, 1995).

De acordo com TAGG et al., (1976), os critérios para se considerar um composto antimicrobiano produzido por microrganismos Gram positivos são: Possuir em sua estrutura um componente ativo biologicamente; apresentar um reduzido espectro de inibição, geralmente sobre microrganismos relacionados taxonomicamente; e ter uma capacidade bactericida frente à cepas sensíveis.

#### 3.6.4.5 Classes de bacteriocinas

Apesar da definição estabelecida por TAGG et al., (1976) para muitas das bacteriocinas estudadas, os resultados obtidos na caracterização destes compostos mostram heterogeneidade quanto às propriedades bioquímicas, peso molecular, espectro de atividade, mecanismo de ação, sistema de produção e



secreção, assim como a organização genética dos operons que codificam estas funções. KLAENHAMMER (1993), em função destes critérios, define quatro classes diferentes de bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas:

**Lantibióticos:** São peptídeos pequenos (menores de 5000 Da, que contém em sua estrutura aminoácidos atípicos, p. e. Nisina), exemplos deste tipo de bacteriocina são Lacticina 481 e Lacticina S.

Os pequenos (menores de 10000 Da), são termoestáveis, hidrofóbicos, atuam sobre a membrana celular. As bacteriocinas mais comuns produzidas pelas bactérias lácticas, pertencem a esta classe. Alguns exemplos destas bacteriocinas são Lactococin A, Lactacin F, Pediocin PA-1 e Pediocin AcH.

**Proteínas termolábeis** de peso molecular superior a 30000 Da. Representativas desta classe são: Helveticina J, Helveticina V-1829, Acidofilucina A e Lactacinas A e B.

Bacteriocinas de estrutura complexa, como: Plantaricina S, Leuconocina S, Lactocina 27 e Pediocina SJ-1.

As bacteriocinas que possuem um amplo espectro de inibição, apresentam um importante valor como aditivos alimentícios ao ser ativas frente a microrganismos danificadores ou patógenos presentes nos alimentos. Além disso, a ação combinada de duas ou mais bacteriocinas pode reforçar consideravelmente a ação inibitória .

#### 3.6.4.6 Propriedades das bacteriocinas

As bacteriocinas de bactérias lácticas apresentam propriedades bioquímicas comuns como a sensibilidade à ação das enzimas proteolíticas e a tolerância a elevadas temperaturas e baixo pH.

Devido a sua natureza protéica, todas as bacteriocinas são inativadas por uma ou mais enzimas proteolíticas, incluindo as de origem pancreática (tripsina e  $\alpha$  quimiotripsina) e algumas de origem gástrica como a pepsina. Esta característica é muito interessante quando se refere à utilização em produtos alimentícios (LLOYD e DRAKE, 1975).

A termo resistência das bacteriocinas das bactérias lácticas é geralmente elevada, mas pode se reduzir significativamente após sua purificação (DAVEY e RICHARDSON, 1981; BAREFOOT e KLAENHAMMER, 1984). Esta característica de termo tolerância parece estar relacionada com sua estrutura molecular normalmente composta por peptídeos pequenos que não representam estrutura terciária. De outro modo algumas bacteriocinas termolábeis possuem maior peso molecular e provavelmente uma estrutura molecular mais complexa. A termo resistência generalizada das bacteriocinas permite que permaneçam ativas após tratamentos térmicos equivalentes a pasteurização da leite (63°C, 30 min; 72°C, 15 seg.), o que supõe uma vantagem adicional para sua utilização (PIARD e DESMAZEAUD, 1992). As bacteriocinas de bactérias lácticas são geralmente estáveis a pH ácido ou neutro, mas são inativas a um pH maior que oito (PIARD e DESMAZEAUD, 1992).

#### 3.6.4.7 Mecanismos de ação

Uma hipótese amplamente aceita sobre o modo de ação das bacteriocinas sugere que a interação de uma bacteriocina com uma célula sensível ocorre em duas etapas (PLATE e LURIA , 1972). A primeira corresponde à adsorção das moléculas da bacteriocina a um receptor específico ou não específico da superfície celular sendo reversível por não produzir nenhum dano fisiológico. Na segunda etapa ocorrem mudanças patológicas irreversíveis por consequência das lesões bioquímicas, como inibição de produção de energia, biossíntese de ácidos nucléicos e proteínas.

De acordo com RAY e DAESCHEL (1992) as moléculas de bacteriocinas de bactérias lácticas se unem a receptores sobre a superfície das células sensíveis, dando lugar à alteração na conformação das moléculas da parede celular, a qual se torna permeável a outras moléculas. As moléculas de bacteriocinas e outras passam pela parede e em contato com a membrana citoplasmática, desestabilizam as funções pela ação detergente, causando perda da viabilidade.

A estrutura destes peptídeos tem duas fases; uma hidrofílica e outra hidrofóbica. Esta estrutura explica a formação de poros a partir de um mecanismo no qual a natureza anfótera da molécula permite a formação de oligômeros que atravessam a membrana formando poros, situam-se nos lados apolares da molécula próximos aos lipídios da membrana e os lados polares dirigidos ao centro do poro. Como consequência, se observa perda de íons K<sup>+</sup>, ATP e em alguns casos aminoácidos e moléculas pequenas.

### 3.7 INÓCULOS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NO ALIMENTO COMO SUBSTITUTO DE ANTIBIÓTICOS

Os probióticos microbianos em aquicultura usualmente se referem a uma única bactéria ou mistura de várias culturas selecionadas de bactérias. Estas bactérias são adicionadas nos sistemas de produção aquícola com o propósito de manipular o sistema ou comunidades microbianas na água, sedimentos, e nas espécies de cultura, para reduzir ou eliminar as espécies de microrganismos patógenos e de modo a estimular o crescimento e a saúde das espécies de organismos aquáticos na aquicultura (HOROWITZ e HOROWITZ, 2002).

A administração de microrganismos vivos como probióticos para prevenir doenças, diminuir a quantidade de sedimentos, estimular o sistema imune dos animais de cultivo e servir como aditivo alimentar, no complemento parcial das formulações alimentícias, é contemplada como uma estratégia alternativa para o tratamento de enfermidades e promoção do crescimento em aquicultura. Um dos modos de aplicação mais recomendados é a exposição das larvas aos probióticos que ainda não tem desenvolvido o trato digestivo. O ovo fertilizado se encontra em meio aquoso, está exposto a bactérias de todo tipo. Uma vez que eclosiona a larva deve formar seu trato digestivo; enquanto não seja aberto esse conduto, permanece estéril. A presença de bactérias lácticas na água de cultura nesse momento é importante para que o trato seja colonizado pelos probióticos, antes que os sítios específicos do canal sejam ocupados por bactérias patógenas oportunistas que diminuirão as possibilidades de vida das larvas. Neste caso existem duas possibilidades: Que as bactérias sejam adicionadas na água antes

da introdução das larvas no tanque de larvicultura e monitoramento dos estádios larvais junto com a inclusão de probióticos no alimento.

Além da competição pelos espaços disponíveis no trato digestivo, os probióticos competem também pela energia ou alimento com as bactérias oportunistas, assim a presença massiva dos primeiros, promove um melhor ambiente digestivo nos hospedeiros. Apesar do desconhecimento de muitos aspectos sobre a interação da flora bacteriana no canal alimentário dos organismos aquáticos, é necessário considerar vários fatores de produção como o custo de manutenção de cepas plenamente identificadas como causadoras de efeitos benéficos em espécies comerciais determinadas. Os estudos sob efeitos dos probióticos em organismos aquáticos estão depositados patentes, não entanto ainda são necessários esforços para a sua otimização de modo que se permita manter a qualidade na ação biológica (SIMOES *et al.*, 2002; GARCIA-ULLOA, 2003).

A LactoMarine (LM; Shimadzu Corporation, Japão) utiliza bactérias lácticas entéricas originalmente isoladas de matéria fecal de bebês humanos saudáveis, com a intenção de obter bactérias lácticas. LM é uma cultura líquida de bactérias entéricas congeladas para ser utilizada em escala piloto, e comercializada como LM «starter» ou cultivos iniciadores de bactérias lácticas LM (Lactomarinas bactérias). Em poucos anos se observou a necessidade do crescimento deste mercado. Estas bactérias são cocos Gram-positivos, com características de estreptococos, como bem se conhece dentro do grupo de bactérias entéricas relacionadas com o grupo de *Lactococcus* e *Enterococcus* sendo formalmente classificado como *Streptococcus*. Algumas espécies deste gênero são amplamente conhecidas como probióticos para utilização na saúde humana (ROLFE, 2000; INUTA *et al.*, 2002). As LM bactérias foram depositadas como patente no Japão (Depósito N<sup>o</sup> 12253) e foram registradas como aditivo alimentar com as patentes japonesas (N<sup>os</sup>. 2727517 e 2730685), (INUTA, 2002).

Atualmente se encontram no mercado alguns produtos de probióticos indicados para certos grupos específicos de microrganismos patógenos. Tais produtos contém microrganismos antagônicos com outras bactérias, usualmente

utilizadas para produção de compostos antibacterianos como substitutos de antibióticos, suplementos alimentares ou como enzimas digestivas. Estes produtos probióticos são introduzidos no alimento eliminando certos grupos de bactérias principalmente os vibrios (HOROWITZ e HOROWITZ, 2002).

### 3.8 ESTIMULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE COM PROBIÓTICOS

A estimulação do sistema imune pela utilização de cepas probióticas foi reportada por vários autores (GILL, *et al*, 2000; RENGPIPAT, *et al*, 2000; SELVIN *et al*, 2004; e GULLIAN, *et al*, 2004) como uma característica a ser considerada na seleção de bactérias. A imunoestimulação é uma alternativa para manter o sistema de defesa ativo, aumentando a resistência a vírus, ou controlando populações bacterianas patogênicas que podem afetar a saúde do hospedeiro.

Nos camarões, vários compostos microbianos tem se apresentado como principais estimulantes das funções celulares, entre eles os  $\beta$ -glucanos, lipopolisacarídeos e peptidoglucanos. Estes compostos podem ativar diretamente as funções celulares agindo diretamente sob as proteínas do plasma, melhorando a eficiência da resposta imune (BACHÈRE, 2003). Os peptidoglucanos estão presentes na parede celular de bactérias Gram (+) e são objeto de investigações para avaliar o potencial de sua administração contra as vibrioses e contra o vírus da mancha branca (ITAMI *et al*, 1998).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MICRORGANISMOS**

De 250 cepas de bactérias lácticas isoladas do intestino de peixe e camarões adultos, foram selecionadas as que apresentaram crescimento facultativo para efetuar os testes de caracterização como microrganismos probióticos. Posteriormente, foi efetuada outra triagem de seleção com o propósito de obter cepas adaptáveis ao trato intestinal do camarão de cultivo, que permitissem uma melhor sobrevivência nas etapas iniciais de desenvolvimento das larvas e durante todo o ciclo biológico do camarão.

Finalmente foram indicadas para o estudo três cepas que reuniram as características desejáveis, as quais foram comparadas com duas cepas de bactérias lácticas obtidas de inóculos comerciais.

#### **4.1.1 Local de captura**

As cepas de bactérias lácticas foram isoladas de espécimes de peixes e camarões adultos capturados em zonas poluídas, de água salobra, localizadas na zona do Oceano Pacífico Del Valle Del Cauca Colômbia (Bahía de Buenaventura). (Figura 1).

**FIGURA 1- LOCAL DE CAPTURA DOS ESPÉCIMES, (BAHÍA DE BUENAVENTURA), COLÔMBIA**



#### 4.1.2 Isolamento e seleção de cepas de bactérias lácticas

Tratos intestinais foram extraídos, macerados em água peptonada, e semeados em meio MRS (DE MAN e ROGOSA, 1960) com azul de anilina por esgotamento, para facilitar a separação das colônias, e posteriormente incubados a 30°C em aerobiose durante 48 h. As colônias separadas foram semeadas novamente em MRS azul de anilina pelo método de estrias, realizou-se também o estudo da morfologia e do crescimento.

O meio MRS com azul de anilina permite reconhecimento das cepas de bactérias lácticas uma vez que as colônias de bactérias lácticas têm a propriedade de assimilar o azul de anilina do meio, além de facilitar o reconhecimento das características morfológicas das colônias (GIRAUD, 1992)

#### 4.1.3 Manutenção das cepas

As cepas isoladas foram repassadas para tubos com caldo MRS e preservadas com 25% de glicerol em tubos de crioconservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior uso. O material a ser utilizado com maior frequência, foi preservado em MRS Agar tubo inclinado por um período de até três semanas e em caldo MRS a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2 SELEÇÃO DAS CEPAS

#### 4.2.1 Análise do perfil da produção de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência ( HPLC)

Após verificação das características de crescimento e morfologia, as cepas isoladas foram semeadas em caldo MRS por 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$ . O caldo de crescimento foi centrifugado a 5.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em membrana de  $0.45\mu$  para preparação da amostra.

A quantificação de ácidos orgânicos foi determinada por HPLC, segundo as condições: Solvente ou fase móvel : ácido sulfúrico a pH 1.5; pressão: 800-900 PSI; volume injetado:  $20\mu\text{l}$ ; temperatura do forno  $65^{\circ}\text{C}$ ; vazão  $0,6\text{ mL/min}$ ; natureza da coluna e tipo de separação: coluna BIORAD aminex HPX 87H com suporte de resina transplantada  $\text{H}^{+}$ (Copolímero de estireno e disulfato de divinilbenzeno). Deste modo foi efetuada uma primeira seleção permitindo comparar os perfis idênticos sabendo-se que os picos variam de uma cultura para outra. Com este método foi efetuada a primeira seleção caracterizando as cepas como homo ou hetero- fermentativas. O número total de cepas produtoras de ácido láctico selecionadas para os testes de caracterização como possíveis cepas



probióticas foi de 21 cepas. Destas foram selecionadas 3 cepas (2, 20 e 21) de acordo com a determinação dos isômeros DL e L+ do ácido láctico, segundo a metodologia recomendada por (JEHANNO et al., 1992).

#### 4.2.2 Poder de inibição frente aos patógenos

##### 4.2.2.1 Ensaio de inibição

A partir das cepas produtoras de ácido láctico, caracterizadas como lácticas, se efetuou uma seleção de cepas inibidoras seguindo um método *in vitro*. A inibição do crescimento de patógenos se efetuou por meio de uma adaptação do método de TAGG e Mc GIVEN (1971). A inibição de patógenos foi determinada pelo halo produzido ao redor do disco de ágar impregnado de bactérias lácticas após 24 horas de crescimento colocado em contato com o meio onde se desenvolve a bactéria patogênica. As zonas claras ao redor dos discos indicam atividade antibacteriana (UA). A medida dos halos foi efetuada considerando o raio. O quadro 1 mostra os microrganismos patogênicos utilizados no teste de inibição. Os estudos de inibição e comparação frente a antibióticos com *V. harveyi*, *V. alginolyticus* e para *Flexibacter maritimus* foram feitos somente para as cepas 2, 20 e 21.

#### QUADRO 1- CEPAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS PARA EFETUAR OS TESTES DE INIBIÇÃO

MICROORGANISMOS PATÓGENOS	PROCEDÊNCIA
<i>Salmonella tiphy</i>	ATCC 10708
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29737
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 29336
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13280
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 9459
<i>E. coli</i>	ATCC 11229
<i>Listeria monocitogenes</i>	ATCC 43251
<i>Flexibacter maritimus</i>	LCM (Lab. de Camarões Marinhos UFSC)
<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 19271 Belgium Co-coordinated Collection of microorganisms
<i>Vibrio alginolyticus</i>	BCCM UH 2068

#### 4.2.2.2 Ensaios comparativos de inibição das bactérias e antibióticos frente aos patógenos

Foram efetuados ensaios de inibição das bactérias lácticas selecionadas e das duas cepas isoladas de inóculo comercial, frente à dez patógenos selecionados e catorze antibióticos, com o propósito de comparar o poder inibitório das bactérias lácticas e dos antibióticos frente aos patógenos. O objetivo foi estudar o uso potencial das bactérias lácticas no combate a infecções causadas por estes patógenos. Foi aplicado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos, método de disco-difusão citado por DOPAZO, *et al.*, (1988).

Os antibióticos utilizados neste estudo foram: ampicilina, cloranfenicol, penicilina, vancomicina, neomicina, oxitetraciclina, carbenicilina, bacitracina, amoxicilina, aztreonam, neomicina e eritromicina, magnamicina, e enrofloxacina.

As cepas de bactérias lácticas foram incubadas por 12 h em ágar MRS a 35°C, e as cepas patogênicas foram cultivadas em caldo triptona soja por 12 h a 37°C; em seguida as bactérias patogênicas foram transferidas à placa de Petri com triptona soja ágar por semeadura em superfície; após foram colocados os discos de antibióticos e os discos de ágar MRS com as cepas de bactérias lácticas selecionadas e as comerciais. Cada teste foi efetuado em duplicata e medido o tamanho do halo.

#### 4.2.2.3 Estudo de viabilidade frente à concentração de sais biliares

Para o estudo de viabilidade das cepas selecionadas frente a diferentes concentrações de sais biliares foi seguido o método recomendado por YIMIN *et al.*, (1998 e 1999), As cepas foram incubadas em caldo MRS durante 24 e 48 h, testando concentrações de 5 e 10% de sais biliares p/v utilizando bile bovina (Sigma), e efetuando-se posteriormente uma contagem para determinar a viabilidade.

#### 4.2.2.4 Produção de gás

Para verificar a produção de gás a partir de glicose foi empregado caldo MRS com 5% de glicose e adicionados tubos de Durham para verificar a presença de gás segundo o método de YIMIN *et al.*, (1999).

#### 4.2.2.5 Atividade de catalase

Para determinar a atividade de catalase, foi colocado peróxido de hidrogênio em solução sobre as colônias de bactérias lácticas. A reação de produção de oxigênio é negativa com a ausência de bolhas formadas em torno das colônias, e positiva quando houver formação de microbolhas. (CONDON, 1987; REQUENA, 1995; DAESCHEL, 1989; BRINK, 1991; HAUGAARD, 1968; DAHL *et al.*, 1989).

#### 4.2.2.6 Estudo de tolerância a NaCl.

As cepas de bactérias lácticas foram semeadas em caldo MRS com diferentes concentrações de sal marinho entre 5,10 e 18%, em seguida foram incubadas durante 24 horas; as contagens de viabilidade foram efetuadas em ágar MRS, e incubadas durante 48 h a 35°C. De acordo com o recomendado por YIMIN *et al.*, (1999).

#### 4.2.2.7 Estudo de viabilidade sob diferentes concentrações de pH

A tolerância a baixos níveis de pH foi medida de acordo com a viabilidade dos microorganismos, após permanecerem por 3 horas nos diferentes níveis de pH (2,5, 3,0 e 7.0), seguindo o recomendado por YIMIN *et al.*, (1999).

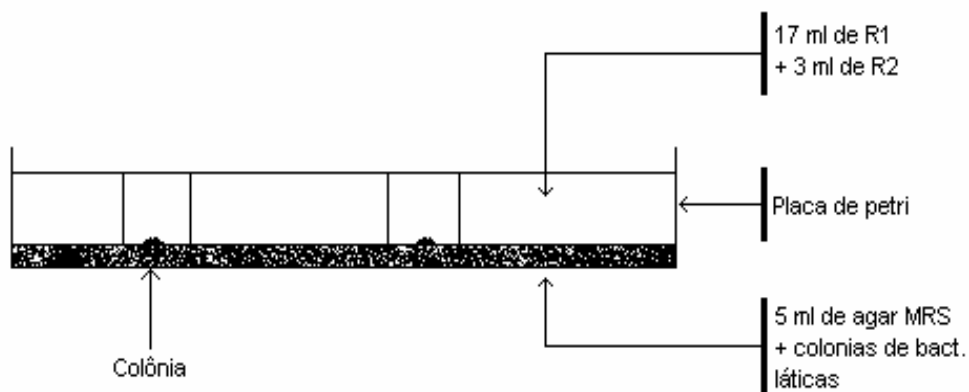
#### 4.2.2.8 Detecção dos isômeros do ácido láctico

Para as cepas selecionadas e para as cepas isoladas de inóculo comercial, foram determinados os isômeros do ácido láctico, seguindo a metodologia recomendada por JEHANNO *et al.*, (1992).

O princípio do método constitui-se de uma reação de óxi-redução enzimática esteroespecífica, catalisada pela enzima lactato desidrogenase, que oxida o lactato em piruvato e reduz simultaneamente o L(+) o a D(-) a uma forma NAD (NADH) que produz uma reação de acople reduzindo o sal de tetrazolium (o violeta de Iodonitrotetrazolium - INT) em presença de diaforase (Sigma). O sal de tetrazolium se reduz em forma um composto insolúvel avermelhado.

Com este método utilizando a D(-) é possível diferenciar as cepas produtoras de ácido láctico D(-) das que produzem os dois tipos de ácido láctico DL láctico pela aparição de um halo avermelhado mais intenso. As cepas produtoras exclusivamente do isômero L(+) láctico se distinguem pela ausência de cor. A figura 2 esquematiza a aplicação do método dos isômeros do ácido láctico.

**FIGURA 2- ESQUEMA DE APLICAÇÃO DO MÉTODO  
DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO**



Na primeira etapa foram despejados em placas de Petri 5 mL de meio MRS agar no qual foi adicionado 100 g/L de celulosa em pó (SIGMA C-6413). No meio foram inoculadas as bactérias lácticas. Uma vez feito o inóculo, as placas foram incubadas durante 48 horas a 35°C.

Após a incubação, a cada placa se adicionaram 20 mL das soluções R1 e R2, preparadas numa solução tampão fosfato 0,1 M a pH 7,5, os quais correspondem a 17 mL da solução R1 e a 3 mL da solução R2.

A composição das soluções 1 e 2 foi a seguinte:

Solução 1:

Agar: 12 g/L, Tween 20 g/L, Celulose 100g/L

Solução 2: NAD 2,87 mg/mL, INT 2 mg/mL, Diaforase 0,72 U/mL, D(-) Idh 28,53 u/mL

Após 20 minutos de incubação, aparece um halo vermelho intenso em volta das colônias produtoras de ácido láctico D(-) e menos intenso em volta das colônias produtoras de ácido láctico DL. As colônias de cepas produtoras de ácido láctico L(+) não apresentam coloração.

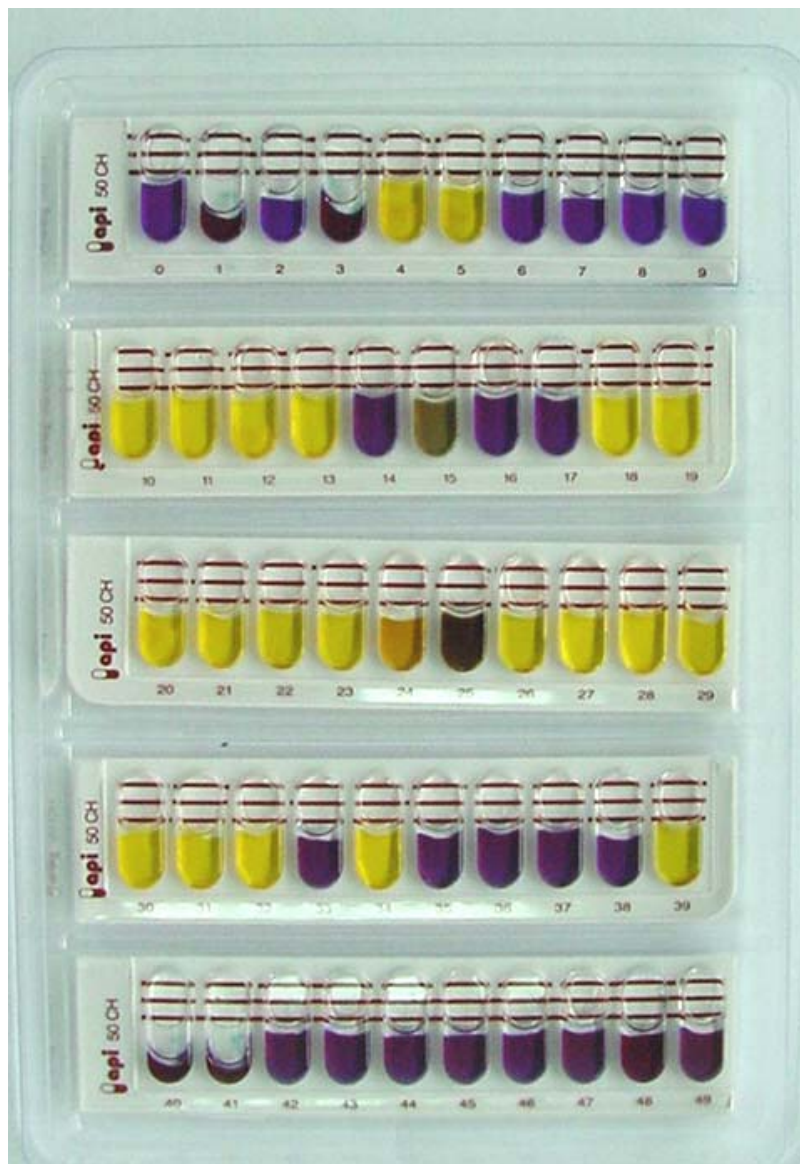
#### 4.2.2.9 Provas bioquímicas

A identificação inicial das cepas selecionadas foi feita mediante a fermentação de carboidratos com a utilização das galerias API 50 CHL para identificação bioquímica das bactérias lácticas (BioMérieux), (De ROISSART e LUQUET, 1994).

O API 50 CHL permite o estudo da fermentação de 49 açúcares. O microrganismo a ser estudado é colocado em suspensão no meio; em seguida é inoculado cada tubo da galeria. Durante a incubação o catabolismo de glucídios conduz à formação de ácidos orgânicos que permitem a viragem do indicador do pH. Os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da cepa, facilitando a identificação ou sua tipagem. Os testes de fermentação de carboidratos foram

efetuados com culturas de 24 horas de crescimento em caldo MRS. As leituras foram efetuadas em 24 e 48 horas após inoculação nas galerias API. A Figura 3 mostra o sistema de galerias para identificação de bactérias lácticas.

**FIGURA 3- GALERIAS API 50 CHL UTILIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS ISOLADAS**



FONTE: a autora

#### 4.2.2.10 Identificação molecular das cepas selecionadas

A identificação das cepas selecionadas se realizou no Centro Multidisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (PQBA) da Universidade Estadual de Campinas.

Para identificação molecular das cepas selecionadas utilizou-se seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene rRNA 16S.

Amplificação do rDNA 16S: A metodologia consistiu na amplificação do DNA ribossomal 16S pela metodologia do PCR. Utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene rRNA 16S de bactérias.

Seqüenciamento: Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram p 10f, 765f, 782r e p1100r.

Análise filogenética: As seqüências parciais de rDNA 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *conting* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparados com as seqüências de rDNA 16S de organismos representados nas bases de dados do RDP Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA (<http://www.cme.msu.edu/RDP/html> MAIDAK *et al.*, 2001) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Foram selecionadas seqüências de organismos relacionados do organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo KIMURA (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987), segundo o software de análise disponível no RDP.

#### 4.2.3 Seleção de meios de cultura para produção de biomassa

Foram testadas cinco formulações para meio de cultura considerando a viabilidade do produto fermentado e da biomassa, após 24 horas de crescimento. O Quadro 2 mostra as formulações testadas. As condições seguidas foram: agitação 120 rpm, e temperatura 30°C durante 24 horas. Cada formulação foi testada para cada uma das cepas selecionadas inicialmente na primeira triagem, sendo estas um total de 21 cepas.

**QUADRO 2- FORMULAÇÃO DOS MEIOS TESTADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ELABORAÇÃO DE INÓCULOS**

Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5
-Melaço de cana 50g/L -Leite bovino integral em pó 140g/L. -Extrato de levedura 27g/L - pH: 6,4	-Açúcar branco 60 g/L -Extrato de levedura 27g/L -Leite bovino desnatado em pó 80g/L -Farelo de trigo 30g/L -pH: 6,2	Açúcar branco 20g/L. -Leite de soja 140 g/L -Soro de leite bovino 130 g/L -Farelo de trigo 30 g/L. - pH: 6,2	-Extrato de levedura 27 g/L -Açúcar branco 25 g/L -Colostro bovino 50 g/L -Farelo de trigo 30 g/L -pH: 6,5	-Açúcar mascavo 50 g/L -Extrato de levedura 27 g/L -Peptona bacteriológica 10 g/L. - pH: 6,2

#### 4.3 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

Para cada um dos meios selecionados após os resultados obtidos com a contagem de células, foi efetuada uma cinética de crescimento para verificar as melhores condições do processo, e posterior elaboração dos inóculos. O equipamento utilizado foi um fermentador INSELTECH LH SGL de dois litros (Figura 4). As condições de processo foram 30°C, e a velocidade de agitação a 120 rpm ; não foi efetuado controle de pH considerando que os microrganismos do estudo são resistentes à índices baixos de pH. Os parâmetros considerados durante o processo de fermentação foram: pH, contagem de células viáveis UFC/ml, consumo de açúcar e produção de ácidos orgânicos. As medições foram efetuadas a cada duas horas durante 24 horas.



**FIGURA 4- BIORREATOR UTILIZADO NAS CINÉTICAS DE FERMENTAÇÃO**



#### 4.3.1 Determinação de pH

As medidas de evolução do pH foram realizadas utilizando um pHmetro HANNA INSTRUMENTS HI 9321. Os dados obtidos da evolução do pH indicaram a produção de ácidos orgânicos no processo.

#### 4.3.2 Contagem de microrganismos viáveis em placa

A técnica de contagem em placa propiciou a informação sobre o número de células viáveis em termos de UFC/mL do substrato em fermentação. Os meios utilizados não permitiram efetuar a leitura por turbidimetria, nem por peso seco, para determinação de biomassa, devido às elevadas quantidades de sólidos em suspensão. Foi diluído um mililitro de amostra em 9 mL de água peptonada ao

0,1%; e efetuadas diluições decimais; de cada diluição foi transferida para placa de petri com MRS-azul de anilina, 0,1 mL da amostra na superfície do ágar e dispersa com pérolas de vidro estéreis. As placas foram incubadas em estufa à 30°C e observadas em 24 e 48 horas; considerando as placas com contagem entre 30 e 300 UFC/mL. O número de colônias foi multiplicado pelo inverso da diluição e por 10 para obter as UFC/mL (LANARA, 1981).

#### 4.3.3 Determinação de açúcar total

Os açúcares totais foram determinados pelo método de DUBOIS, (1956), conhecido como método de antrona. Previamente foi preparada uma curva padrão com diferentes concentrações da solução padrão de glicose; os valores obtidos da leitura de densidade ótica (D.O) a 525 nm. foram plotados versus a concentração em mg/L, e obtida a equação da reta. A dosagem dos açúcares das amostras do estudo, foi efetuada sob 2,5 ml de amostra previamente diluída em água destilada e adicionado 5 mL de antrona preparada em ácido sulfúrico. Os valores obtidos nas leituras das amostras foram calculados pela equação da reta, obtidos na curva padrão e multiplicados pelo fator de diluição.

#### 4.3.4 Determinação da presença de ácido láctico por HPLC

Para avaliar a síntese deste metabólito foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Chromtography) Shimadzu LC-10 AD. Esta técnica permitiu determinar a concentração de ácidos orgânicos, açúcares simples e complexos devido a mecanismos de separação de moléculas por ação combinada de troca iônica, separação por peso molecular e interações hidrofóbicas usando colunas empacotadas com resina (Aminex HPX 87H, 300mm). A resina é um copolímero de estireno e sulfonato de divinilbenceno. A carga da resina assegura as interações iônicas enquanto que o poliestireno favorece as interações de tipo hidrófobo.

Os elementos complementares do HPLC envolvem um refratômetro diferencial Shimadzu RID-10A que reconhece a substância por diferença do

ângulo de refração, emitindo sinais ao integrador Shimadzu C-R 6<sup>A</sup>, neste se pode realizar a leitura diretamente das concentrações em g/L integrando a área sob a curva, estabelecendo proporcionalmente a concentração deste metabólito. As condições seguidas para análise foram: solvente de arraste H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 6 mM; temperatura da coluna de 65°C; fluxo do solvente de 0,8 mL/min.; pressão entre 44 e 48 bars; volume da injeção de 20 µl. As amostras foram previamente centrifugadas a 4000 rpm e filtradas em filtro Millipore de 0,20 µm para serem injetadas.

#### 4.3.5 Cálculos da fermentação

Os cálculos considerados para as cinéticas para os meios selecionados foram os definidos por CRUEGER (1993) e RODRÍGUEZ *et al.*, (2003).

Sendo a velocidade específica de crescimento definida pela equação:

$$\mu_{MAX} = \frac{d \ln X}{dt},$$

O tempo de duplicação celular :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu},$$

Os resultados obtidos nos permitiram determinar das amostras ou tratamentos mais adequados em termos de tempo-taxa de crescimento durante o processo de fermentação.

#### 4.4 ELABORAÇÃO DOS INÓCULOS

Os inóculos foram elaborados utilizando o meio selecionado 3 (conforme o Quadro 2 já mostrado). De acordo as cepas selecionadas foram elaborados três inóculos correspondentes às cepas 20, 21 e 2 para as cepas 24 e 25, isoladas de inóculos comerciais, completando um total de cinco inóculos. A seqüência seguida para a produção dos inóculos foi conforme a Figura 5, consitindo numa fermentação por 12 a 15 horas, seguindo as condições estabelecidas durante as

cinéticas efetuadas para o estudo de crescimento de cada microrganismo. A fermentação foi interrompida na fase estacionária de acordo aos resultados obtidos nas cinéticas; o material fermentado foi colocando em refrigeração a 5°C, seguindo o recomendado por FONSECA *et al.*, (2001).

O pH do substrato foi medido e neutralizado até pH 5,5 com NaOH; posteriormente o material foi centrifugado sob refrigeração a 5.000 rpm por 10 min., retirado o sobrenadante, pesado o teor de sólidos e misturado com 5% de glutamato de sódio como agente crioprotetor (DE VALDEZ e DIEKMANN, 1993). Para liofilização, o material preparado foi refrigerado a 5°C por 12 h seguindo o descrito por PANOFF *et al.*, (1995) como uma etapa de crioadaptação. Após a preparação do substrato fermentado, o material foi liofilizado por 12 horas a 50 mm Hg num liofilizador marca Terroni Favel LF1500. Uma vez liofilizado, o material foi embalado em sacos plásticos de calibre 4 e conservado a temperatura ambiente para posteriores análises.

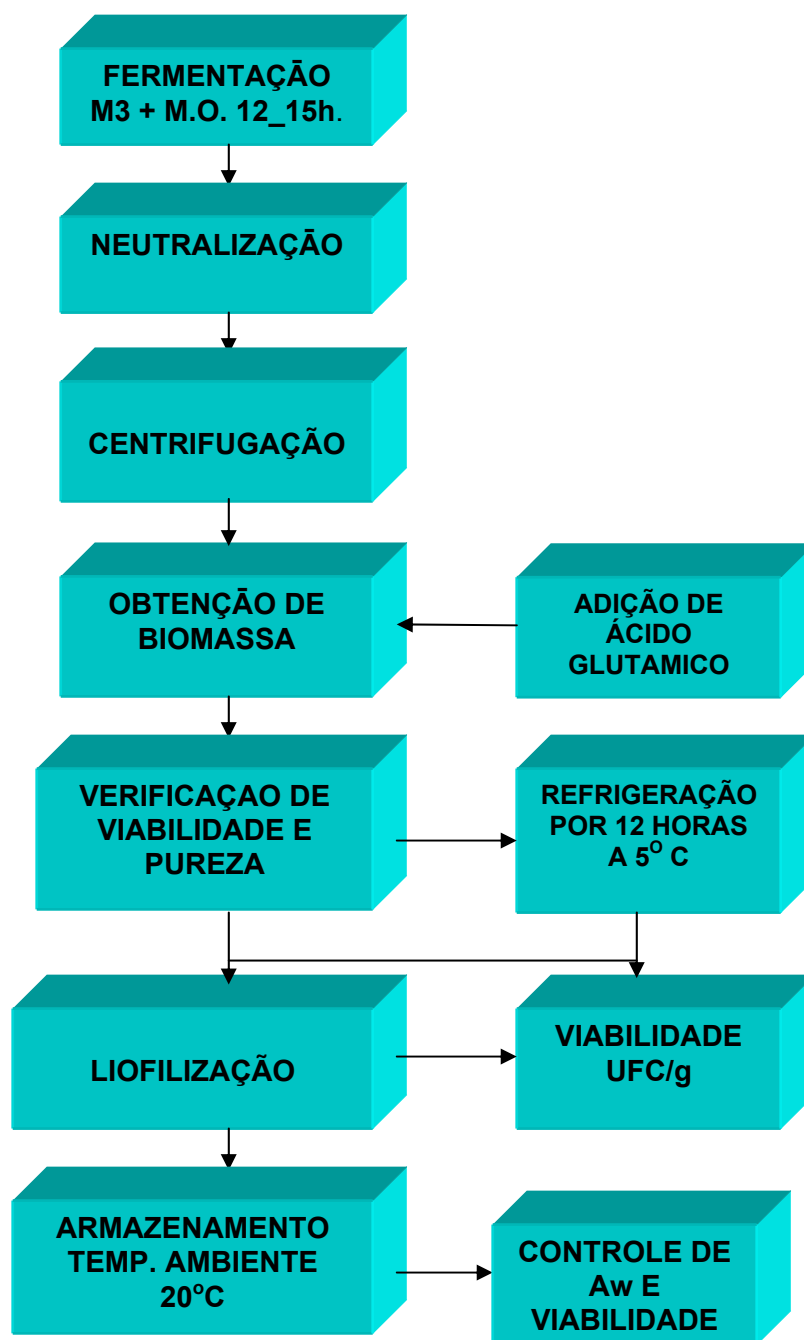
#### 4.4.1 Viabilidade dos inóculos

As provas de viabilidade de inóculos foram realizadas através da contagem de células viáveis UFC/g, determinando-se a sobrevivência das células após o processo de liofilização. Os resultados foram acompanhados pela determinação do pH e da atividade de água ( $A_w$ ) do produto. Durante quatro meses foram efetuadas medições considerando estes parâmetros para as amostras de inóculos preparadas com as cinco cepas, com o propósito de estabelecer um estudo de viabilidade no tempo, e comparar a evolução do comportamento entre os diferentes inóculos elaborados.

#### 4.4.2 Determinação da atividade da água ( $A_w$ )

A atividade da água foi determinada num aparelho Tripette e Renaud Agro, estabelecendo uma calibração prévia com Lítio e NaCl a 24°C, até estabilização da leitura. Após verificação, colocou-se a amostra de material até obter estabilização.

FIGURA 5- FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS INÓCULOS



#### 4.4.3 Determinação de pH

Para determinação do pH foi pesado um grama de inóculo liofilizado e colocado por meia hora em 10 ml de água destilada, e efetuada a leitura.

#### 4.5 INCLUSÃO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS NA RAÇÃO DE LARVAS E CAMARÕES

Segundo estudos realizados por SIMÕES *et al.*, (2002) e GATESOUBE (1999), se referindo respeito ao uso de cepas probióticas na aquicultura, demonstraram que a adição destes microrganismos na água, não é tão eficaz e podem provocar incremento das concentrações de amônia nos tanques.

Portanto, neste estudo se trabalhou com as bactérias láticas incorporadas no alimento, para verificar o efeito destas no intestino utilizando uma maior concentração, e não na água, com o propósito de comprovar o impacto na sobrevivência, crescimento e resposta imune dos camarões frente a doenças.

Os inóculos iniciais foram elaborados segundo a formulação 3 e as condições do item 4.4 a partir do material liofilizado no estudo adicionando a proporção de 1g por litro de substrato.

A ração incluindo as cepas probióticas selecionadas para alimentação dos camarões e larvas, foi elaborada a partir de alimento comercial pulverizando ou "pellet" e umidecendo com 50% de água, 3,82% de gelatina sem sabor, adicionando posteriormente 100 ml de inóculo líquido de bactérias láticas com  $10^{11}$  UFC/mL por kilo de ração.

Uma vez homogeneizado o material, foi colocado em estufa a 35°C por 24 horas para permitir o desenvolvimento das bactérias no substrato. O produto fermentado foi retirado, efetuada uma contagem de células UFC/g em meio MRS e em seguida guardado em bolsas plásticas a 5°C para posterior peletização e secagem. A secagem do material peletizado se efetuou em estufa de circulação de ar a 35°C por 12 h; logo se retiraram os "pellets". A quantidade de bactérias láticas presentes (UFC/g) na ração elaborada com probiótico foi determinada pelo método de contagem por diluição em placa com meio MRS.

#### 4.6 ENSAIOS *IN VIVO* COM APLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SELECIONADOS.

##### 4.6.1 Ensaios de sobrevivência e crescimento larval

Foram efetuados sete experimentos correspondentes aos cinco inóculos ou cepas, o tratamento controle e o tratamento com antibiótico Oxitetraciclina como promotor de crescimento, com três repetições, sendo utilizados aquários de 40 litros (Figura 6) com filtro aereador, temperatura constante de 28°C e renovação semanal de 40% de água. O número de indivíduos por aquário foi de cem, com desenvolvimento larval inicial entre PL 7 e PL 8. Foi verificada mortalidade diariamente e efetuada amostragem aleatória semanal com 20 indivíduos para determinar o crescimento (em mm) durante cinco semanas. O tratamento seguido no estudo para os experimentos é mostrado no Quadro 3.

**QUADRO 3- TRATAMENTOS EFETUADOS PARA DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA**

TRATAMENTO	CEPA
(1)	(20)
(2)	(21)
(3)	(2)
(4)	(24)•
(5)	(25)•
(6)	Antibiótico Oxitetraciclina
(7)	Amostra controle (só alimento)

• CEPAS ISOLADAS DE INÓCULO COMERCIAL

**FIGURA 6- CONDICIONAMENTO DOS AQUÁRIOS NO EXPERIMENTO**  
**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO LARVAL**



FONTE: A autora

Os indivíduos foram medidos do rosto à bifurcação do extremo posterior com ajuda de um microscópio estereoscópio. Foram alimentados três vezes ao dia de acordo com SOULAP (1999).

#### 4.6.1.1 Crescimento larval

O controle do crescimento larval foi efetuado durante 5 semanas, por medição das larvas semanalmente com ajuda de um estereoscópio.

O delineamento experimental selecionado para este estudo foi um desenho totalmente casualizado com sub-amostra. As hipóteses analisadas foram:

$H_0$ : O efeito médio do fator cepas é igual

$H_a$ : Ao menos uma destas cepas é diferente



#### 4.6.1.2 Sobrevivência

Na análise de sobrevivência foi utilizada a prova (DMS) de mínima diferença significativa. Diariamente foram observados os ensaios verificando mortalidade e semanalmente se reportaram os dados acumulados.

#### 4.6.1.3 Aderência intestinal das bactérias lácticas

A comprovação da aderência das bactérias ao intestino de larvas de camarão foi determinada mediante cortes de intestinos fresco e montagem para reconhecimento das bactérias nas diferentes secções de intestino sob observação microscópica, de acordo ao recomendado por SIMÕES *et al.*, (2002). Por outro lado, foram macerados intestinos frescos e semeados em MRS para verificar a viabilidade, das bactérias lácticas em UFC/g das bactérias lácticas ministradas

### 4.7 ENSAIO DESAFIO COM *Vibrio harveyi*

#### 4.7.1 Estudo do efeito de interação competitiva das cepas probióticas frente ao *V. harveyi*

Para verificar o efeito de interação competitiva das bactérias lácticas frente ao *V. harveyi* foram testadas diferentes concentrações de *Vibrio harveyi* ( 1,0; 0,5 e 2,5 mL) com cada uma das bactérias lácticas (1,0; 0,5 e 0,25 mL) respectivamente para verificar o efeito de inibição das lácticas e conhecer a dose e proporção a ser aplicada nos tratamentos. Os inóculos de bactérias lácticas foram desenvolvidos em caldo MRS durante 24 horas e ajustados a uma concentração de  $3,2 \times 10^7$  UFC/mL. Os inóculos de *V. harveyi* foram desenvolvidos em caldo BHI a 30°C por 24 horas a sua concentração ajustada a  $3,0 \times 10^7$  UFC/mL. As culturas com as diferentes concentrações foram inoculadas em água do mar estéril a 30°C com agitação contínua por 24 horas. Em seguida foi realizada uma contagem em placa de Petri com ágar BHI para determinar as UFC/mL de *V. harveyi* presentes.

#### 4.7.1.1 Preparação dos inóculos:

*Vibrio harveyi*: As bactérias puras de *V.harveyi* foram cultivadas em caldo BHI (Infusão de cérebro e coração) com 2% de NaCl a temperatura de 30°C durante 24 horas. A densidade de microrganismos presentes foi determinada mediante o inóculo em placas de petri com Agar BHI por diluições sucessivas em 9 mL de água estéril. (A concentração utilizada foi de  $10^7$  UFC/mL).

Cepas de bactérias lácticas: Verificada a pureza das cepas lácticas, semearam-se os inóculos no meio desenvolvido (Meio 3) para produção de biomassa de bactérias lácticas. O crescimento foi a 30°C com agitação contínua à 120 rpm durante 15 horas. A concentração de microrganismos foi ajustada a  $5,4 \times 10^7$  UFC/mL .

#### 4.7.1.2 Efeito probiótico das cepas selecionadas para proteção

Com o propósito de verificar o efeito probiótico das cepas para inibição ou proteção frente aos patógenos foi efetuado um desafio frente ao *Vibrio harveyi*, um dos patógenos causadores de mortalidade em larvicultura (SAULNIER *et al.*, 2000; AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2004). Foi selecionado o *Vibrio harveyi* 19271 LMG isolado da larvicultura do Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina). Utilizaram-se pós-larvas PL2 obtidas do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC as quais foram testadas em seis tratamentos conforme indicado no Quadro 4. Para cada tratamento foram utilizados 150 indivíduos em recipientes com 1 L de água e quatro repetições (Figura 7).

As larvas foram alimentadas com dieta líquida comercial com 8% de proteína, 3,5% de extrato etéreo, 1% de fibra e 80% de umidade, três vezes ao dia. Nos tratamentos com inclusão de probiótico, foi adicionando 1mL/L de inóculo de microrganismos lácticos na concentração  $5,4 \times 10^7$  UFC/mL, de acordo com o tratamento e segundo descrito por AGUIRRE-GUZMAN *et al.*,(2001). Os ensaios

foram efetuados com quatro repetições para cada tratamento. Depois da aplicação de inóculo de *Vibrio harveyi* 1ml/L em concentração de  $3,0 \times 10^7$  UFC/mL, foi avaliada a taxa de sobrevivência das larvas.

**QUADRO 4- TRATAMENTOS EFETUADOS NO ENSAIO DE DESAFIO COM *V. harveyi***

Ensaio Nº 1	Ensaio Nº 2	Ensaio Nº 3	Ensaio Nº 4	Ensaio Nº 5	Ensaio Nº 6
Cepa 20 x 3 dias	Cepa 21 x 3 dias	Cepa 2 x 3 dias	Cepa 25 x 3 dias	Controle sem adição de probiótico	Sem adição de probióticos x 3 dias
Adição de <i>V. harveyi</i> . terceiro dia	Adição de <i>V. harveyi</i> . terceiro dia	Adição de <i>V. harveyi</i> . terceiro dia	Adição de <i>V. harveyi</i> . terceiro dia	Controle sem adição de probiótico nem <i>V. harveyi</i>	Adição de <i>V. harveyi</i> . terceiro dia

**FIGURA 7- MONTAGEM EFETUADA NOS ENSAIOS DE DESAFIO  
COM *V. harveyi* PARA PL2**



FONTE: A autora

Para avaliação estatística do experimento foi realizado uma análise de variância para identificação das diferenças entre os tratamentos e efetuado o teste de Tukey de separação de medias ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8 ENSAIOS DE DESAFIO COM *Vibrio alginolyticus* EM CAMARÕES JUVENIS PARA VERIFICAR O EFEITO IMUNO-ESTIMULANTE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

Os animais utilizados foram provenientes de lotes de juvenis com diagnóstico positivo para vírus da mancha branca (WSSV) efetuado por PCR realizado pelo LCM. Foi efetuado um novo teste em larvas juvenis de 6 g, com o propósito de verificar o efeito de proteção e resposta imune dos camarões tratados com bactérias lácticas. Foram analisados hemolinfa, contagem de hemócitos, atividade antibacteriana na hemolinfa, presença de bactérias lácticas no trato digestivo e sobrevivência.

O ensaio foi realizado em tanques de 40 litros com sistema de aeração a 32°C. O número de indivíduos por tanque foi de 20 e quatro repetições por grupo.

A cepa probiótica selecionada foi a 2. O desafio foi efetuado com a cepa patogênica de *Vibrio alginolyticus* 2068 HU desenvolvida em caldo BHI suplementado com 2% de NaCl a 30°C por 24 horas, sendo injetada numa concentração de  $6,0 \times 10^7$  UFC/mL no quarto segmento abdominal numa quantidade de 100 µL.

O grupo de camarões com tratamento de probióticos foi alimentado duas vezes por dia, durante uma semana antes de serem submetidos ao desafio com a cepa de bactéria láctica 2 incorporada na ração de acordo ao item 4.5.

O grupo controle foi alimentado com ração comercial sem adição de probióticos.

O tratamento estatístico aplicado para verificar a presença de diferenças entre os tratamentos foi o t-teste, com ( $p < 0,05$ ) de nível de significância.

#### 4.8.1 Avaliação do efeito imunoestimulante

Para avaliar o efeito imuno-estimulante do probiótico foram efetuadas as provas imunitárias de contagem total de hemócitos (THC), coagulação de hemolinfa e atividade antibacteriana de acordo ao recomendado por MALDONADO *et al.*, (2004) e GULLIAN *et al.*,(2004).

Obtenção da hemolinfa: Foram extraídos 3µl de hemolinfa do sinus ventral dos camarões com agulha calibre 25 e seringa de 5 ml, contendo 3µL de solução de citrato de sódio 23 mM como solução anticoagulante a 4°C (Figuras 8 e 9).

Contagem total de hemócitos (THC): As contagens de hemócitos totais (THC) foram efetuadas com hemocitômetro ou câmara de Neubauer em microscópio, usando o contraste de fase com resolução de 40X de acordo com o descrito por MUÑOZ *et al.*,(2002). O número de hemócitos foi expresso em milhões de células por ml e a fórmula hemocitária em percentagens hemocitárias. Os valores entre  $5 \times 10^6$  h/mL foram considerados aceitáveis, segundo o estabelecido por GULLIAN *et al.*,(2004). A fórmula para cálculo de hemócitos é expressada por:

$$\text{THC} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de hemócitos} \times 10^4 \times \text{volume total de amostra na seringa}}{\text{Quantidade de hemolinfa coletada}}$$

Coagulação: O tempo de coagulação da hemolinfa foi determinado imediatamente após a extração da hemolinfa, pressionando a parte ventral do camarão na lâmina côncava com quantidade de 0,5 µL de hemolinfa e medido o tempo de coagulação.

Atividade antibacteriana: A atividade antibacteriana da hemolinfa foi quantificada por semeadura em placa no meio TCBS Agar de 0,1 ml para estimar o crescimento bacteriano (UFC/ml), aplicando os métodos descritos por SUNG *et al.*,(1996) e RENGIPAT *et al.*,(2000). As amostras foram coletadas aleatoriamente de todos os tratamentos e comparados os resultados de inibição. A

presença elevada de microrganismos na hemolinfa indica infecções severas e não efeito antibacteriano na hemolinfa.

**FIGURA 8- EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA**



FONTE: A autora

**FIGURA 9- HEMOLINFA EXTRAÍDA PARA ANÁLISE DE HEMÓCITOS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**



FONTE: A autora

Colonização de bactérias lácticas no epitélio intestinal: Para verificação da presença e adesão das bactérias lácticas no epitélio intestinal foi realizada a semeadura do conteúdo intestinal e de intestino proveniente de camarões tratados e sem tratar em meio diferencial MRS Agar com azul de anilina, incubando por 48 horas a 30°C.

A presença de colônias de coloração azul indicaram a presença das bactérias lácticas viáveis, determinando-se as UFC/g presentes nas amostras. Este procedimento foi acompanhado pela verificação das características morfológicas correspondentes com a cepa probiótica 2 aplicada nos tratamentos.

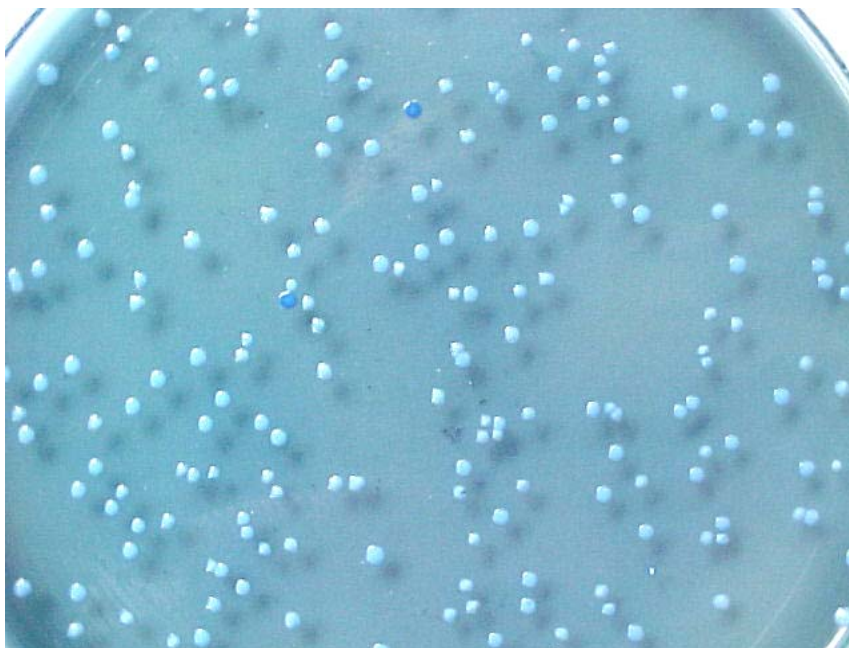
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MICRORGANISMOS

#### 5.1.1 Seleção das cepas

Foram isoladas 250 cepas como bactérias lácticas conforme os procedimentos citados no item 4.2, utilizando o meio MRS com azul de anilina para diferenciação das cepas de bactérias lácticas de outras. A Figura10 mostra estas propriedades .

**FIGURA 10- CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DESENVOLVIDAS EM MEIO MRS COM AZUL DE ANILINA.**



FONTE: A autora

Nem todas as colônias das diferentes espécies de bactérias lácticas se desenvolvem com características iguais podendo se diferenciar quanto ao tamanho, bordas, elevação centro das colônias e bordas. Autores como (GIRAUD,1992) já utilizaram o azul de anilina para seleção de bactérias lácticas em isolamento, contudo nenhum deles utiliza as características de crescimento



diferencial neste meio para diferenciação de espécies. As características de desenvolvimento das cepas estão descritas no Quadro 5 .

**QUADRO 5- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS 21 CEPAS  
SELECIONADAS NA PRIMEIRA ETAPA**

<b>CEPAS</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>C2 10-3 AMM</b> (1)	Colônias azuis médio, tamanho médio . Bacilos curvos em pares Gram +
<b>C210-2 AZOM</b> (2)	Colônias azuis médio. Cremosa. Coco-bacilos em pares Gram +
<b>J8 BAR 10-1</b> (3)	Colônias azul claras, pequenas;Cocos grandes Gram +
<b>C12 10-2 AZMM</b> (4)	Colônias azuis ;tamanho médio Bacilos grandes Gram +
<b>1OSB</b> (5)	Colônias azuis escuras pequenas ; cápsula +++; cocobacilos Gram +
<b>BC210-3 AZMM</b> (6)	Colônias azuis médio; tamanho médio; Bacilos medianos Gram +
<b>J8 10-1 AZOG( 1)</b> (7)	Colônias azuis pequenas; Estreptococos Gram +
<b>BC2T2 AZOP A</b> (8)	Colônias azuis obscuras pequenas. Bacilos em cadeias longas. Gram +
<b>J8 10-2 AZMM 1</b> (9)	Colônias azuis médio, pequenas; Estreptococos Gram +
<b>1DMS</b> (10)	Bacilos coco bacilos meios,com cápsula, agrupados em em pares. Gram (+) .
<b>J8-10-1 AMM 1B</b> (11)	Colônias azuis médio, Tamanho meio. estafilococos Gram +
<b>J8 10-1 AZOP (4)</b> (12)	Cocos de tamanho médio,estreptococos, cápsula +++ Gram +
<b>1CL (E) AZ</b> (13)	Colônias azuis claras;Bacilococos em pares formando cadeias. Gram +
<b>J8 10-1 (1)</b> (14)	Colônias azuis escuras, grandes; bacilococos em duplas. Gram +
<b>BC2 10-2 AZOM-A</b> (15)	Colônias azuis escuras, tamanho médio; bacilos finos. Gram +
<b>J8 10-2 AMG</b> (16)	Colônias grandes azuis claras; bacilos pequenos, Gram +
<b>CAR 3 10-1</b> (17)	Colônia azul pequena Estreptococos. Gram +
(20)	Colônias pequenas, azul meio. Bacilos curtos Em pares, Gram (+)
(21)	Colônias medianas azul médio, bacilos pequenos em empalizada. Gram +
(24)	Colônia azul escura , tamanho médio, cocos estafilococos Gram+
(25)	Colônias pequenas, azul claras;Bacilos finos médios. Gram +

## 5.2 PERFIL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

No Quadro 6 se apresentam os perfis de produção de ácidos orgânicos das cepas isoladas com características de bactérias lácticas .

**QUADRO 6- PERFIL CARACTERÍSTICO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS  
PRODUZIDOS PELAS  
21 CEPAS SELECIONADAS NA PRIMEIRA ETAPA**

CEPAS	ACIDOS ORGÂNICOS	CEPAS	ACIDOS ORGÂNICOS
<b>C2 10-3 AMM (1)</b>	Cítrico 0,656 g/L Succínico 0,016 g/L Láctico 25,776 g/L	<b>J8 10-1 AZOP (4) (12)</b>	Cítrico 0,599 g/L Succínico 0,063 g/L Láctico 27,538 g/L
<b>C210-2 AZOM (2)</b>	Cítrico 3,564 g/L Succínico 0,034 g/L Láctico 28,024 g/L	<b>1CL (E) AZ (13)</b>	Cítrico: 1,909 g/L Succínico 0,011 g/L Láctico 27 g/L
<b>J8 BAR 10-1 (3)</b>	Láctico 26 g/L	<b>J8 10-1 (14)</b>	Cítrico 1,50 g/L Succínico 0,050 g/L Láctico 20,575 g/L
<b>C12 10-2 AZMM (4)</b>	Cítrico 3,545 g/L Succínico 0,99 g/L Láctico 26,918 g/L	<b>BC2 10-2 AZOM-A (15)</b>	Cítrico 0,627 g/L Succínico 0,01 g/L Láctico 24,617 g/L
<b>1OSB (5)</b>	Cítrico 0,627 g/L Succínico 0,01 g/L Láctico 24,617 g/L	<b>J8 10-2 AMG (16)</b>	Láctico 47,8 g/L
<b>BC210-3 AZMM (6)</b>	Acido cítrico 0,012 g/L Succínico 0,018 g/L Láctico 25,4 g/L	<b>CAR 3 10-1 (17)</b>	Cítrico 1,944 g/L Succínico 0,066 g/L Láctico 21,858 g/L Isobutírico 0,038 g/L
<b>J8 10-1 AZOG( 1) (7)</b>	Cítrico 0,493 g/L Succínico 0,082 g/L Láctico 21,200 g/L	<b>(20)</b>	Cítrico 2,43 g/L Succínico 0,1 g/L Láctico 18,94 g/L Fórmico 0,95 g/L
<b>BC2T2 AZOP A (8)</b>	Cítrico 1,759 g/L Succínico 0,061 g/L Láctico 22,636 g/L	<b>(21)</b>	Cítrico 0,94 g/L Succínico 0,12 g/L Láctico 22,09 g/L Formico 0,69 g/L Acético 2,56 g/L Propionico 0,09 g/L Valérico ----
<b>J8 10-2 AZMM 1 (9)</b>	Succínico 0,064 g/L Láctico 26,703 g/L	<b>(24)</b>	Cítrico 0,09 g/L Succínico 0,12 g/L Láctico 11,45 g/L Fórmico 10,63 g/L Acético 0,17 g/L Propionico 0,04 g/L Valérico ----
<b>1DMS (10)</b>	Cítrico 1,918 g/L Succínico 0,052 g/L Láctico 27,325 g/L Fórmico 0,081 g/L	<b>(25)</b>	Cítrico ----- Succínico 0,09 g/L Láctico 11,03 g/L Fórmico 0,59 g/L Acético 2,42 g/L Propionico 0,05 g/L Valérico ----
<b>J8-10-1 AMM 1B (11)</b>	Succin. 0,120 g/L Lactico 26,3 g/L Fórmico 0,13 g/L		

O perfil de características de ácidos orgânicos produzidos pelas diferentes cepas selecionadas, foi determinado seguindo a metodologia descrita no item

4.2.1. Deste modo se permitiu a diferenciação entre as cepas isoladas inicialmente, devido às comparações entre os perfis de produção de ácidos, identificando as cepas com características idênticas, além da seleção de cepas homofermentativas. Das 250 cepas isoladas, foram selecionadas para o estudo aquelas com maior produção de Ácido láctico e enquadradas com características homofermentativas com 85% ou mais de ácido láctico produzido, comparando com os outros ácidos durante seu metabolismo, conforme o citado por HAMMES e VOGEL,(1995).

No Quadro 6 podem ser observadas as características de produção de ácidos orgânicos das cepas selecionadas como homofermentativas. As cepas isoladas de inóculos comerciais (24 e 25) apresentaram características heterofermentativas, com produção de ácido fórmico e láctico como principais produtos do metabolismo.

Todas as cepas isoladas e selecionadas produziram ácido láctico acima de 18 g/L, sendo este o principal produto do metabolismo, enquanto que as cepas comerciais apresentaram concentrações bem mais baixas de ácido láctico, entre 10 e 11 g/L.

Os ácidos orgânicos produzidos pela maioria das cepas isoladas foram ácido cítrico e succínico em pequenas quantidades, sendo o ácido fórmico produzido somente pelas cepas 10, 20 e 21 e pelas cepas obtidas de inóculos comerciais.

O ácido propiônico foi produzido pelas cepas 21, 24 e 25. O ácido succínico esteve presente em todas as cepas em pequenas quantidades, exceto nas cepas 3 e 16. ANNUK et al.,(2003) correlacionaram a produção de ácidos orgânicos em cepas consideradas probióticas, encontrando que as produtoras de ácido láctico e acético exerceram atividade inibitória frente a quase todos os patógenos. Outros autores como MISHRA e LAMBERT(1996), associaram a elevada atividade antagônica com a produção de ácidos orgânicos das bactérias lácticas, ocasionando o declínio do pH e, deste modo, inibindo o crescimento dos microrganismos patogênicos. OWEHAND (1998), se refere à atividade antimicrobiana como um efeito da interação dos diferentes ácidos produzidos

pelas bactérias lácticas. Pode-se considerar que todas estas afirmações podem ter uma relação significativa na inibição da atividade antibacteriana. Neste estudo foram testadas cepas com maior produção de ácido láctico ou homo-fermentativas e quantidades mínimas de qualquer outro ácido orgânico. Concentrações elevadas de ácido láctico podem ocasionar a baixa do pH no meio, inibindo outros microrganismos, mas não necessariamente indicando que seja esta a principal causa de inibição bacteriana, a que pode ser devida a outros metabólitos secundários. Deste modo deve ser considerada a importância da presença de metabólitos antimicrobianos na seleção de cepas consideradas como probióticas.

### 5.3 PODER DE INIBIÇÃO FRENTE AOS PATÓGENOS

O poder de inibição das lácticas selecionadas frente a patógenos foi testado com os dez microrganismos Gram positivos e Gram negativos, cocos e bacilos, citados no item, 4.2.2.1, incluindo os mais comuns, causadores de doenças na carcinicultura. Os resultados obtidos para as cepas selecionadas e comerciais são demonstrados nos quadros 7 e 8.

A maioria das cepas selecionadas apresentou características inibitórias frente a patógenos, produzindo halos de inibição entre 2 e 9 mm, principalmente com *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*, sendo estes os microrganismos que mais afetam o desenvolvimento larval de camarões de cultivo (GÓMEZ-GIL, 2000 e MORIARTY, 1999). De acordo com estes resultados pode-se comprovar a ação inibitória *in vitro* exercida pelas bactérias lácticas sobre bactérias patógenas Gram negativas. As figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16 mostram a inibição produzida por algumas das bactérias isoladas frente aos patógenos.

Estudos efetuados por EL-NAGGAR (2004), demonstraram a atividade antagônica das cepas lácticas frente a *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, sendo igualmente demonstrado neste estudo pelas cepas isoladas. Os resultados indicam que quase todas as cepas lácticas inibiram o *V. cholerae* com exceção das cepas 17, 10 e 25. A atividade antagônica *in vitro* obtida neste estudo foi baseada nos trabalhos publicados por JACOBSEN *et al.*, (1999). A atividade

antagônica pode ser devida a substâncias produzidas pelas cepas probióticas. Algumas cepas de lactobacilos podem produzir algum tipo de bacteriocina como o lactacin, produzido pelo *L. acidophilus* ou plantaricin produzido por *L. plantarum* (ANDERSON *et al.*,1988; RACCACH *et al.*,1989). Os lactobacilos também produzem peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos como o ácido láctico e acético que inibem o crescimento de muitas cepas patogênicas Gram-negativas (LU e WALKER, 2001).

#### QUADRO 7- CAPACIDADE DE INIBIÇÃO FRENTE A PATÓGENOS

CEPAS	HALO DE INIBIÇÃO EM mm FRENTE AOS PATOGENOS TESTADOS	CEPAS	HALO DE INIBIÇÃO EM mm FRENTE AOS PATOGENOS TESTADOS
<b>C2 10-3 AMM (1)</b>	<i>E. coli</i> 5 mm. <i>S. aureus</i> 4 mm. <i>Listeria m.</i> 4 mm. <i>Salmonella t.</i> 5mm <i>Pseudomona a.</i> 5 mm. <i>Aeromonas h.</i> 5 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 7 mm. <i>Serratia m.</i> 4mm.	<b>J8 10-1 AZOP (4) (12)</b>	<i>E. coli</i> 5mm <i>S. aureus</i> 4mm <i>Listeria M.</i> 2mm <i>Salmonella t.</i> 3mm <i>Pseudomonas a.</i> 4mm <i>Aeromonas h.</i> 4mm <i>Vibrio cholerae</i> 6mm <i>Serratia m.</i> 4 mm.
<b>C210-2 AZOM (2)</b>	<i>E. coli</i> 5 mm. <i>S. aureus</i> 4 mm. <i>Listeria M.</i> 3 mm. <i>Salmonella t.</i> 5 mm <i>Pseudomona a.</i> 6 mm <i>Aeromonas h.</i> 4 mm <i>Vibrio cholerae</i> 6 mm. <i>Serratia M.</i> 5 mm. <i>Vibrio harveyi</i> 8 mm <i>Vibrio alginolyticus</i> 5 mm. <i>Flexibacter maritimus</i> 6 mm	<b>1CL (E) AZ (13)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm <i>S. aureus</i> 5 mm <i>Listeria M.</i> 4 mm. <i>Salmonella t.</i> 4 mm. <i>Pseudomona a.</i> 6 mm <i>Aeromonas h.</i> 4 mm <i>Vibrio cholerae</i> 5 mm <i>Serratia m.</i> 7mm
<b>J8 BAR 10-1 (3)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm. <i>S. aureus</i> 4 mm <i>Listeria m.</i> 5 mm <i>Salmonella t.</i> 5 mm. <i>Pseudomona a.</i> 4 mm. <i>Aeromonas h.</i> 6 mm. <i>Vibrio cholerae</i> ---- <i>Serratia m.</i> 4 mm.	<b>J8 10-1 (14)</b>	<i>E. coli</i> 5mm. <i>S. aureus</i> 5mm. <i>Listeria m.</i> 5mm <i>Salmonella t.</i> 4mm <i>Pseudo mona a.</i> 4 mm <i>Aeromonas h.</i> 4 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 5 mm <i>Serratia m</i> 2 mm
<b>C12 10-2 AZMM (4)</b>	<i>E. coli</i> 5mm <i>S. aureus</i> 4mm <i>Listeria m.</i> 2mm <i>Salmonella t.</i> 3mm <i>Pseudomona a.</i> 4mm <i>Aeromonas h.</i> 4mm <i>Vibrio cholerae</i> 6mm <i>Serratia m.</i> 4 mm.	<b>BC2 10-2 AZOM-A (15)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm. <i>S. aureus</i> 5 mm. <i>Listeria m.</i> 7 mm. <i>Samonella</i> 4mm. <i>Pseudomonas a.</i> 6 mm. <i>Aeromonas h.</i> 3 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 6 mm. <i>Serratia m.</i> 5 mm.
<b>1OSB (5)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm. <i>S. aureus</i> 4 mm. <i>Listeria m.</i> 5 mm. <i>Salmonella t.</i> 4 mm <i>Pseudomonas a.</i> 4 mm. <i>Aeromonas h.</i> 6 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 6 mm. <i>Serratia m.</i> 5 mm.	<b>J8 10-2 AMG (16)</b>	<i>E. coli</i> 6 mm. <i>S. aureus</i> 5 mm. <i>Listeria m.</i> 2 mm. <i>Salmonella</i> 5 mm. <i>Pseudomona a</i> 5 mm. <i>Aeromonas h.</i> 4 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 4 mm. <i>Serratia m.</i> 3 mm.

## QUADRO 8- CAPACIDADE DE INIBIÇÃO FRENTE A PATÓGENOS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS EM ESTUDO

CEPA	HALO DE INIBIÇÃO EM mm FRENTE AOS PATOGENOS TESTADOS	CEPA	HALO DE INIBIÇÃO EM mm FRENTE AOS PATOGENOS TESTADOS
<b>BC210-3 AZMM (6)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm. <i>S. aureus</i> 5 mm <i>Listeria m.</i> 3 mm <i>Salmonella t.</i> 5 mm <i>Pseudomonas a.</i> 5 mm <i>Aeromonas h.</i> 6 mm <i>Vibrio cholerae</i> 5 mm <i>Serratia m.</i> 5mm	<b>CAR 3 10-1 (17)</b>	<i>E. coli</i> 5 mm <i>S. aureus</i> 3 mm. <i>Listeria m.</i> 4 mm. <i>Salmonella t.</i> 5 mm. <i>Pseudomonas a.</i> 4 mm. <i>Aeromonas h.</i> 4 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 0 mm. <i>Serratia m</i> 0 mm.
<b>J8 10-1 AZOG( 1) (7)</b>	<i>E. coli</i> 5 mm. <i>S. aureus</i> 4 mm. <i>Listeria m.</i> 3 mm. <i>Salmonella t.</i> 5 mm <i>Pseudomona a.</i> 6 mm <i>Aeromona h.</i> 4 mm <i>Vibrio cholerae</i> 6 mm. <i>Serratia m.</i> 5 mm.	<b>(20)</b>	<i>E. coli</i> 5 mm <i>S. aureus</i> 7 mm. <i>Listeria m.</i> 5 mm <i>Salmonella thyp.</i> 5 mm <i>Pseudomona a</i> 6mm. <i>Aeromona h</i> 6 mm <i>Vibrio cholerae</i> 8 mm <i>Serratia m.</i> 6 mm <i>Vibrio harveyi</i> 7mm <i>Vibrio alginolitycus</i> 6mm <i>Flexibacter maritimus</i> 7 mm
<b>BC2T2 AZOP A (8)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm. <i>S. aureus</i> 5 mm <i>Listeria m.</i> 4 mm <i>Salmonella t.</i> 4 mm. <i>Pseudomona a.</i> 4 mm <i>Aeromonas h.</i> 0mm. <i>Vibrio cholerae</i> 2 mm. <i>Serratia m.</i> 2 mm	<b>(21)</b>	<i>E. coli</i> 5mm <i>S. aureus</i> 7mm <i>Listeria m.</i> 5mm <i>Salmonella thyp.</i> 5 mm <i>Pseudomona a.</i> 6 mm <i>Aeromona h.</i> 5 mm <i>Vibrio cholerae</i> 7 mm <i>Serratia m.</i> 5 mm <i>Vibrio harveyi</i> 9 mm <i>Vibrio alginolitycus</i> 5 mm <i>Flexibacter maritimus</i> 7 mm
<b>J8 10-2 AZMM 1 (9)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm. <i>S. aureus</i> 4mm <i>Listeria M.</i> 5mm <i>Salmonella</i> 5mm <i>Pseudomonas</i> 4mm <i>Aeromonas</i> 3mm <i>Vibrio cholerae</i> 5mm <i>Serratia</i> 5mm	<b>(24)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm <i>S. aureus</i> -3mm <i>Listeria m.</i> 3 mm <i>Salmonella thyp.</i> 4 mm <i>Pseudomona a.</i> 0 mm. <i>Aeromona h.</i> 0 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 2 mm <i>Serratia m.</i> 3mm
<b>1DMS (10)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm <i>S. aureus</i> 5 mm. <i>Listeria</i> 4mm <i>Salmonella</i> 4 mm. <i>Pseudomona</i> 5 mm. <i>Aeromonas</i> 7 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 0 mm. <i>Serratia m.</i> 0 mm.	<b>(25)</b>	<i>E. coli</i> 4 mm <i>S. aureus</i> 2mm <i>Listeria m.</i> 4 mm <i>Salmonella thyp.</i> 3 mm <i>Pseudomona a.</i> 2mm <i>Aeromona h.</i> 0 mm. <i>Vibrio cholerae</i> 0 mm. <i>Serratia m.</i> 0 mm.
<b>J8-10-1 AMM 1B (11)</b>	<i>E. coli</i> 6mm <i>S. aureus</i> 4mm <i>Listeria M.</i> 5mm <i>Salmonella</i> 5mm <i>Pseudomonas</i> 5mm <i>Aeromonas h.</i> 0 mm. <i>Vibrio Cholerae</i> 2mm <i>Serratia m.</i> 2mm.		

**FIGURA 11- HALO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA APRESENTADO PELAS CEPAS LÁCTICAS DO ESTUDO FRENTE A *E. coli*.**



FONTE: A autora

**FIGURA 12- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A *Salmonella thyphi* DAS CEPAS LÁCTICAS 2 E 20**



FONTE: A autora

**FIGURA 13- INIBIÇÃO FRENTE A *Vibrio cholerae* PELAS CEPAS LÁCTICAS DO ESTUDO**



**FIGURA 14- INIBIÇÃO FRENTE A *Serratia marcescens* PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO.**





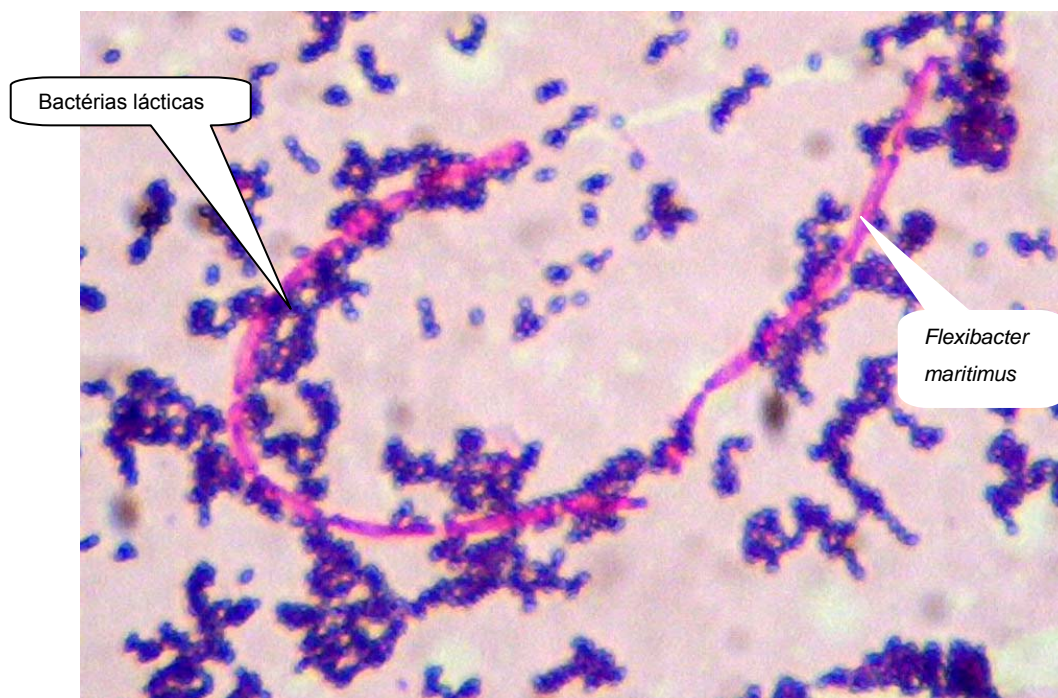
FIGURA 15- HALOS DE INIBIÇÃO DAS CEPAS 2 E 20 FRENTE A *Vibrio alginolyticus*



FIGURA 16- INIBIÇÃO FRENTE A *Flexibacter maritimus* PELAS CEPAS 20 E 21



**FIGURA 17- ADESÃO À PAREDE CELULAR DE *Flexibacter maritimus* DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO (100 X)**



Nos estudos realizados para inibição do patógeno *Flexibacter maritimus* se encontrou que as bactérias lácticas foram observadas aderidas na parede celular do patógeno (Figura 17). Pode ser, portanto este o mecanismo pelo qual ocasionam a inibição, mediante processos enzimáticos de degradação da sua parede celular; porém não se conhece nenhuma referência a respeito na literatura consultada.

A literatura pouco reporta o uso de bactérias lácticas isoladas de peixe ou camarão para inibição de microrganismos patogênicos INUTA *et al.*, (2002) reporta o uso de bactérias entéricas nomeadas como Lacto-marinhas, isoladas de fezes humanas de bebês saudáveis, com a intenção de obter bactérias lácticas para controle de patógenos em culturas de larvas de camarão com bons resultados para algumas doenças. VUYST *et al.*, (2004) testaram bactérias lácticas presentes

normalmente em trato digestivo humano e animal frente a *Salmonella thypimurium* SL 1344 para comprovar o potencial de atividade antimicrobiana, verificando a efetividade inibidora destas cepas. Pode ser possível que as cepas selecionadas e isoladas neste estudo sejam de origem de trato digestivo de animais superiores e humanos, ou até de origem vegetal, devido ao lugar de localização dos camarões capturados para isolamento das cepas, perto da Bahía de Buenaventura (Colômbia) onde chegam efluentes provenientes de rios e da cidade de Buenaventura, com carga biológica elevada.

Pode-se afirmar que estas cepas se adaptaram com êxito ao sistema digestivo dos camarões *Litopenaeus vannamei*. Com os resultados obtidos, as cepas isoladas neste estudo tem potencial probiótico com propriedades antagonicas frente aos patógenos, específicos presentes no cultivo de camarões.

#### 5.4 ESTUDO DE RESISTÊNCIA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS BILIARES

Para efetuar o estudo de viabilidade das bactérias lácticas frente a concentrações de sais biliares foi seguida a metodologia de YIMIN *et al.*, (1999 e 1998) descrita no item 4.2.2.3. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro 9.

**QUADRO 9- RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS FRENTE A  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS BILIARES**

<b>CEPAS</b>	<b>CRESCIMENTO EM MEIO MRS (UFC/mL)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO DE 5% (UFC/mL)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO DE 10% (UFC/mL)</b>
<b>C2 10-3 AMM (1)</b>	6,0 X 10 <sup>9</sup>	3,8 X 10 <sup>8</sup>	4,1 x 10 <sup>8</sup>
<b>C210-2 AZOM (2)</b>	5,2 X 10 <sup>9</sup>	4,8 X 10 <sup>8</sup>	3,5 x 10 <sup>8</sup>
<b>J810-1 BAR AZMM (3)</b>	3,4 X 10 <sup>9</sup>	8,6 X 10 <sup>9</sup>	5,1 x 10 <sup>7</sup>
<b>C1 10-2 AZMM (4)</b>	6,2 x 10 <sup>10</sup>	7,3 x 10 <sup>8</sup>	2,5 x 10 <sup>8</sup>
<b>1OSB (5)</b>	6,2 x 10 <sup>10</sup>	8,3 x 10 <sup>8</sup>	4,5 x 10 <sup>9</sup>
<b>BC2 10-3 AZMM (6)</b>	5,2 X 10 <sup>8</sup>	4,2 X 10 <sup>7</sup>	4,8 x 10 <sup>6</sup>
<b>J8 10-1 1AZOG (7)</b>	3,8 X 10 <sup>8</sup>	1,0 X 10 <sup>7</sup>	3,2 x 10 <sup>6</sup>
<b>BCT2 AZOP A (8)</b>	3,5 X 10 <sup>8</sup>	1,0 X 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>7</sup>
<b>J8 10-2 AZMM 1 (9)</b>	7,5 X 10 <sup>9</sup>	5,4 X 10 <sup>8</sup>	4,6 x 10 <sup>9</sup>
<b>1 DMS (10)</b>	5,4 X 10 <sup>10</sup>	6,0 X 10 <sup>8</sup>	7,8 x 10 <sup>9</sup>
<b>J8 10-2 AMM 1 B (11)</b>	6,7 X 10 <sup>10</sup>	5,5 X 10 <sup>10</sup>	9,8 x 10 <sup>10</sup>
<b>J8 10-1 AZOP 4 (12)</b>	2,2 X 19 <sup>9</sup>	3,4 X 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>
<b>1CLE A2 (13)</b>	1,2 X 10 <sup>10</sup>	5,0 X 10 <sup>10</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup>
<b>J8 10-1-1 (14)</b>	2,3 X 10 <sup>10</sup>	3,3 X 10 <sup>9</sup>	3,9 x 10 <sup>9</sup>
<b>BC2 10-2 AZOM A (15)</b>	2,5 x 19 <sup>9</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	4,3 x 10 <sup>7</sup>
<b>8 10-2 AMG (16)</b>	.9,0 X 10 <sup>10</sup>	5,2 X 10 <sup>9</sup>	8,9 x 10 <sup>7</sup>
<b>CAR 10-1 3 (17)</b>	8,2 X 10 <sup>9</sup>	4,2 X 10 <sup>8</sup>	5,4 x 10 <sup>7</sup>
<b>(20)</b>	6,0 x 10 <sup>10</sup>	3,4 x 10 <sup>8</sup>	4,6 x 10 <sup>8</sup>
<b>(21)</b>	8,0 x 10 <sup>10</sup>	6,0 x 10 <sup>8</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>
<b>(24)</b>	8,4 x 10 <sup>10</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>	7,3 x 10 <sup>7</sup>
<b>(25)</b>	6,4 x 10 <sup>10</sup>	6,4 x 10 <sup>8</sup>	9,2 x 10 <sup>7</sup>

As concentrações de sais biliares a que foram submetidas as cepas, não parecem afetar o nível da população de bactérias lácticas.

As contagens com 5% de concentração para a maior parte das cepas permaneceram entre 10<sup>9</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Em concentrações de 10% , foi observado que algumas cepas diminuiram uma casa decimal em relação ao 5% de concentração de bile , ficando os níveis mais baixos a 10<sup>6</sup> UFC/mL. As cepas 11 e 13 não foram afetadas pelas

concentrações de sais biliares, permanecendo com um nível semelhante à cultura comparativa com MRS sem sais biliares.

As cepas comerciais, provenientes de inóculos, apresentaram uma diminuição até  $10^7$  UFC/mL em concentração de 10% de bile. Os resultados demonstram que as cepas isoladas no estudo são resistentes a concentrações de sais biliares elevadas, mostrando inclusive uma maior resistência frente a sais biliares quando comparadas com as comerciais de inóculo, portanto, apresentam uma característica desejável como probióticas.

CAI *et al.*, (1998) isolaram microrganismos candidatos a probióticos de intestino de linguado *Paralichthys olivaceus*, que apresentaram bom crescimento em concentrações de 10% de sais de bile, verificando que estas cepas são excelentes probióticos específicos para esta espécie de peixe.

Tais resultados indicam a importância e a necessidade de isolar microrganismos da própria cavidade intestinal das espécies de interesse, para serem aplicados como probióticos. Desta forma os microrganismos podem apresentar adaptabilidade muito maior às condições intestinais, especialmente em concentrações de sais biliares do que as cepas obtidas de outras fontes.

## 5.5 PRODUÇÃO DE GÁS E DETERMINAÇÃO DE CATALASE

Para todas as cepas Gram positivas foi efetuado o teste de formação de gás a partir de glicose, seguindo a metodologia descrita nos itens 4.2.2.4 e 4.2.2.5. A maioria das cepas isoladas e testadas, incluindo as cepas do isolado comercial não apresentaram reação positiva na produção de gás a partir de glicose.

A produção de gás é uma característica bioquímica utilizada para a indústria de alimentos e como ferramenta bioquímica de identificação; já que nem todas as bactérias lácticas têm a propriedade de produção de gás a partir da glicose (ROISSART e LUQUET, 1994).

No quadro 10 são indicadas as bactérias lácticas com produção de gás. As cepas 3, 4, 9, 12, 13 e 17 foram positivas para produção de gás, enquanto a prova de catalase foi negativa para a maioria das cepas lácticas. Os resultados

concordam com o citado por ROISSART e LUQUET (1994), onde a maior parte das cepas lácticas tem como característica apresentar catalase negativa.

#### QUADRO 10- RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE GÁS E ATIVIDADE DE CATALASE

CEPAS	GÁS A PARTIR DE GLICOSE	ATIVIDADE DE CATALASE
<i>C2 10-3 AMM</i> (1)	–	–
<i>C210-2 AZOM</i> (2)	–	–
<i>J810-1 BAR AZMM</i> (3)	+	–
<i>C1 10-2 AZMM</i> (4)	+	+
<i>1OSB</i> (5)	–	–
<i>BC2 10-3 AZMM</i> (6)	–	–
<i>J8 10-1 1AZOG</i> (7)	–	–
<i>BCT2 AZOP A</i> (8)	–	–
<i>J8 10-2 AZMM 1</i> (9)	+	–
<i>1 DMS</i> (10)	–	–
<i>J8 10-2 AMM 1 B</i> (11)	–	–
<i>J8 10-1 AZOP 4</i> (12)	+	–
<i>1CLE A2</i> (13)	+	–
<i>J8 10-1-1</i> (14)	–	+
<i>BC2 10-2 AZOM A</i> (15)	–	–
<i>8 10-2 AMG</i> (16)	–	–
<i>CAR 10-1 3</i> (17)	+	–
(20)	–	–
(21)	–	–
(24)	–	–
(25)	–	–

#### 5.6 TOLERÂNCIA A NaCl

A maior parte das cepas isoladas apresentaram resistência às diferentes concentrações de salinidade, com viabilidades ótimas sendo este um dos critérios de seleção para elaboração dos inóculos. O Quadro 11 apresenta os resultados obtidos para tolerância a salinidade das bactérias lácticas isoladas.

**QUADRO 11- VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS A DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE NaCl**

CEPAS	CONCENTRAÇÃO DE 5% (UFC/mL)	CONCENTRAÇÃO DE 10% (UFC/mL)	CONCENTRAÇÃO DE 18% (UFC/mL)
<i>C2 10-3 AMM (1)</i>	$3,2 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$
<i>C210-2 AZOM (2)</i>	—	—	—
<i>J810-1 BAR AZMM (3)</i>	$8,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5$
<i>C1 10-2 AZMM (4)***</i>	$2,5 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	—
<i>10SB (5)</i>	$3,2 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	—
<i>BC2 10-3 AZMM (6)</i>	$4,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	—
<i>J8 10-1 1AZOG (7)</i>	$5,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^8$
<i>BCT2 AZOP A (8)</i>	$2,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^3$	—
<i>J8 10-2 AZMM 1 (9)</i>	$3,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	—
<i>1 DMS (10)</i>	$4,0 \times 10^8$	—	—
<i>J8 10-2 AMM 1 B (11)</i>	$5,0 \times 10^8$	—	—
<i>J8 10-1 AZOP 4 (12)</i>	$3,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
<i>1CLE A2 (13)</i>	$5,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
<i>J8 10-1-1 (14)</i>	$1,2 \times 10^7$	$3,9 \times 10^9$	$2,3 \times 10^6$
<i>BC2 10-2 AZOM A (15)</i>	$4,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
<i>8 10-2 AMG (16)</i>	$2,0 \times 10^7$	$8,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
<i>CAR 10-1 3 (17)</i>	$3,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$9,6 \times 10^5$
<i>(20)</i>	$2,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$
<i>(21)</i>	$9,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
<i>Cepa comercial inóculo (25)</i>	$4,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$
<i>Cepa comercial inóculo (24)</i>	$3,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^5$	—

A partir de 10% de concentração de NaCl as viabilidades diminuem mas em concentrações de 18% ainda as viabilidades permanecem aceitáveis com níveis de sobrevivência de  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL. Segundo ROISSART *et al.*, (1994), caracterizam as bactérias lácticas como pouco resistentes à salinidade elevada, citando as concentrações mais elevadas entre 6 e 9%. A característica de

resistência à salinidades elevadas das cepas no estudo é devida muito provavelmente, ao fato de estar adaptadas às condições salobras da sua origem.

## 5.7 ESTUDO DE VIABILIDADE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE pH

A maior parte das cepas, apresentaram a pH 3.0 um crescimento entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL (Quadro 12).

**QUADRO 12- VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO A DIFERENTES NÍVEIS DE pH.**

CEPAS	pH 2.5 (UFC/mL)	pH 3.0 (UFC/mL)	pH 7.0 (UFC/mL)
<i>C2 10-3 AMM</i> (1)	$1,0 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$6,0 \times 10^9$
<i>C210-2 AZOM</i> (2)	$5,0 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$	$5,2 \times 10^9$
<i>J810-1 BAR AZMM</i> (3)	$2,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$3,4 \times 10^9$
<i>C1 10-2 AZMM</i> (4)	$8,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
<i>1OSB</i> (5)	$4,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$6,2 \times 10^{10}$
<i>BC2 10-3 AZMM</i> (6)	$4,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
<i>J8 10-1 1AZOG</i> (7)	$6,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
<i>BCT2 AZOP A</i> (8)	$3,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$
<i>J8 10-2 AZMM 1</i> (9)	$3,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^9$
<i>1 DMS</i> (10)	$7,0 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	$5,4 \times 10^{10}$
<i>J8 10-2 AMM 1 B</i> (11)	$3,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	$6,7 \times 10^{10}$
<i>J8 10-1 AZOP 4</i> (12)	$3,2 \times 10^8$	$8,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$
<i>1CLE A2</i> (13)	$2,2 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^{10}$
<i>J8 10-1-1</i> (14)	$3,1 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$
<i>BC2 10-2 AZOM A</i> (15)	$6,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9$
<i>J8 10-2 AMG</i> (16)	$3,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^{10}$
<i>CAR 10-1 3</i> (17)	$4,0 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$	$8,2 \times 10^9$
(20)	$4,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^{10}$
(21)	$3,2 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^{10}$
Cepa comercial (24)	$2,4 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$
Cepa comercial (25)	$3,4 \times 10^8$	$8,1 \times 10^8$	$5,3 \times 10^{10}$



A pH 2,5 o crescimento diminui para  $10^6$  UFC/mL nas cepas 5, 6, 7 e 8, e para o restante das cepas permaneceu entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL.

Determinações de pH do hepatopâncreas do camarão efetuadas neste estudo indicaram valores entre 3.5 – 3.8.

De acordo com ROISSART *et al.*, (1994), as bactérias lácticas apresentam crescimento ótimo entre pH 6,5 e 7 enquanto a partir de pH 4,5, o crescimento celular diminui apesar de ter um bom desenvolvimento a pH inferior à 4,0. Portanto, tais bactérias são capazes de resistir a baixos pH comuns no ambiente digestivo do camarão.

Esta propriedade é altamente desejável em processos fermentativos de produção de inóculos, já que as culturas não precisariam controle de pH. O fato de ser isoladas de intestino, demonstra sua resistência à pH baixo, para suportar a passagem por vias digestivas até se instalar no intestino.

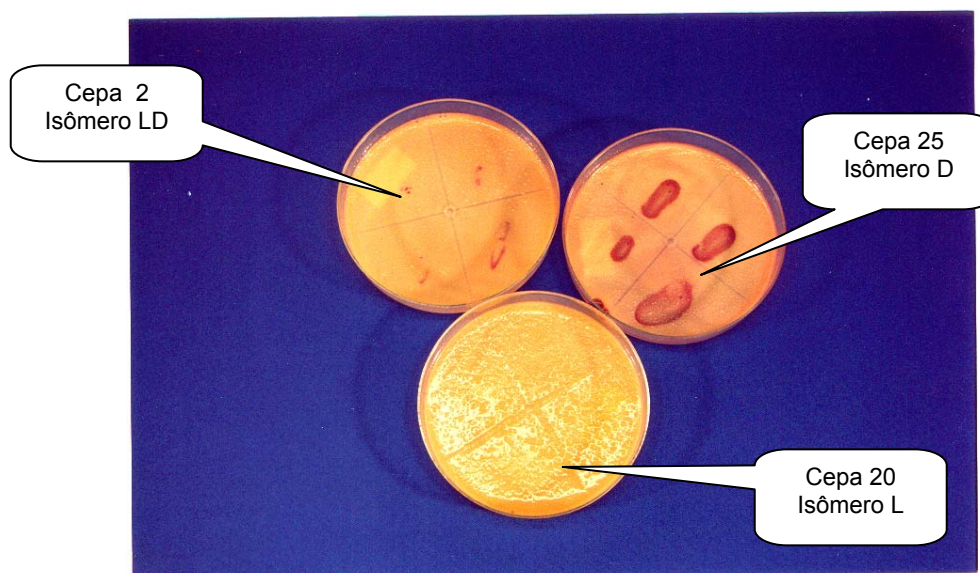
## 5.8 DETECÇÃO DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO

Segundo o método de JEHANNO, (1992) foi encontrado que a maioria das cepas testadas apresentaram isômeros do tipo D- e DL; sendo poucas as cepas detectadas como produtoras de isômero L+, confirmando o referenciado por FULLER, (2002) e ROISSART *et al.* (1994).

Considerando a avaliação da FAO (1966) e o confirmado por JEHANNO (1992), foram consideradas para a elaboração dos inóculos só as cepas que apresentaram isômeros DL e L+. O Quadro 13 mostra os isômeros produzidos pelas cepas isoladas. A Figura 18 mostra a detecção dos isômeros segundo o método JEHANNO (1992), de acordo com as características já descritas no item 4.2.2.8.

De acordo ao recomendado pela FAO e pelas características apresentadas, e por suas outras características probióticas foram selecionadas as cepas 2, 20 e 21.

**FIGURA 18- ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO DAS CEPAS 2, 20 E 25 DO ESTUDO**



**QUADRO 13- ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁCTICO PRODUZIDOS PELAS BACTÉRIAS LÁCTICAS**

CEPAS	Isômeros do ácido láctico	CEPAS	Isômeros do ácido láctico
<i>C2 10-3 AMM (1)</i>	D	<i>J8 10-2 AMM 1 B (11)</i>	D
<i>C210-2 AZOM (2)</i>	DL	<i>J8 10-1 AZOP 4 (12)</i>	D
<i>J810-1 BAR AZMM (3)</i>	D	<i>1CLE A2 (13)</i>	D
<i>C1 10-2 AZMM (4)</i>	DL	<i>J8 10-1-1 (14)</i>	DL
<i>1OSB (5)</i>	DL	<i>BC2 10-2 AZOM A (15)</i>	D
<i>BC2 10-3 AZMM (6)</i>	DL	<i>8 10-2 AMG (16)</i>	L
<i>J8 10-1 1AZOG (7)</i>	D	<i>CAR 10-1 3 (17)</i>	D
<i>BCT2 AZOP A (8)</i>	D	<i>(20)</i>	L
<i>AZMM 1 (9)</i>	D	<i>(21)</i>	DL
<i>1 DMS (10)</i>	DL	<i>(24)</i>	DL
		<i>(25)</i>	D

## 5.9 ENSAIOS COMPARATIVOS DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E ANTIBIÓTICOS FRENTE A PATÓGENOS

Os ensaios comparativos de inibição de patógenos com bactérias lácticas e antibióticos foram efetuados conforme o descrito no item 4.2.2.2; os resultados da inibição estão demonstrados nos quadros 14 e 15. Estes ensaios foram efetuados somente com as cepas selecionadas com melhores características probióticas isoladas do estudo cepas 2, 20 e 21 e com as cepas isoladas do inóculo comercial 24 e 25.

**QUADRO 14- ENSAIO COMPARATIVO DO EFEITO DE INIBIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS E BACTÉRIAS LÁCTICAS FRENTE AOS PATÓGENOS SELECIONADOS**

ANTIBIÓTICO	CEPAS PATOGÊNICAS (Halos de inibição em mm)						
	<i>Pseudomona</i>	<i>Listeria m.</i>	<i>Serratia m.</i>	<i>Salmonella t.</i>	<i>Staphylococcus a</i>	<i>Aeromonas a.</i>	<i>E.coli</i>
Ampicilina	2,5 mm	9,0 mm	4,5 mm	8,0 mm	20,0mm	3,2 mm	5,0 mm
Cloramfenicol	10,0mm	12,5mm	12,5mm	11,5mm	15,0 mm	10,0 mm	12,2 mm
Penicilina	0,0 mm	9,0 mm	9,0 mm	1,0 mm	22,0mm	2,0 mm	0,0 mm
Vancomicina	0,0 mm	7,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	9,5 mm	4,0 mm	6,0 mm
Neomicina	3,0 mm	5,5 mm	6,0 mm	3,0 mm	6,5 mm	2,0 mm	3,0 mm
Oxitetraciclina	0,0 mm	17,0mm	8,5 mm	13,5 mm	21,5mm	0,0 mm	2,2 mm
Carbenicilina	10,0 mm	11,5mm	10,5mm	10,0 mm	23,5 mm	12,1 mm	9,0 mm
Bacitracina	0,0 mm	3,0 mm	3,0 mm	0,0 mm	3,0 mm	2,5 mm	3,2 mm
Amoxicilina	11,5 mm	9,0 mm	3,0 mm	10,0mm	18,5 mm	8,0 mm	9,0 mm
Aztreonan	15,5 mm	0,0 mm	17,5mm	17,0 mm	0,0 mm	0,0 mm	4,0 mm
Cepa 2	5,0 mm	5,0 mm	5,0 mm	4,0mm	7,0 mm	6,0 mm	4,0 mm
Cepa 20	6,0 mm	6,0 mm	6,0 mm	5,0 mm	7,0 mm	6,0 mm	5,0 mm
Cepa 21	6,0 mm	5,0 mm	5,0 mm	5,0 mm	7,0 mm	5,0 mm	5,0 mm
Cepa 24	5,0mm	3,0mm	4,0mm	4,0mm	5,0mm	4,0mm	4,0 mm
Cepa 25	5,0 mm	2,0 mm	5,0 mm	5,0 mm	4,0 mm	5,0 mm	5,0 mm

Todas as cepas lácticas incluindo as comerciais, apresentaram boa inibição frente aos patógenos testados (2 a 7 mm). Cada patógeno testado apresentou um antibiótico específico que exerceu seu melhor poder inibitório, sendo o cloranfenicol o que melhor resposta apresentou em termos gerais para todos os patógenos com halos de inibição entre 12 e 15 mm. Entretanto, deve ser considerado o grau de toxicidade que apresenta este antibiótico para os seres

humanos (AMORNCHAI, 2002; MERCADO & PESCA, 2002), além da resistência que os microrganismos podem desenvolver frente a ele SAHUL HAMEED *et al.*, (2003).

A oxitetraciclina que é um dos antibióticos permitidos pela FDA na indústria de aquicultura Mac MILLAN *et al.* (2004), não apresentou inibição para alguns dos principais patógenos testados responsáveis por doenças em cultivos de pos-larvas de camarão, tais como *Aeromonas sp.* e *Pseudomonas sp.* além do que os microrganismos patógenos também apresentam resistência a este antibiótico. O Quadro 15 mostra o efeito inibitório dos antibióticos e das cepas lácticas selecionadas, para aos patógenos mais comuns na aquicultura. As figuras 19, 20, 21, 22 e 23 mostram a comparação do poder de inibição de algumas bactérias lácticas e antibióticos frente aos patógenos testados.

**QUADRO 15- ENSAIO COMPARATIVO DO EFEITO INIBITÓRIO DOS ANTIBIÓTICOS E AS BACTÉRIAS LÁCTICAS SELECIONADAS FRENTE AOS MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS MAIS COMUNS EM AQUICULTURA.**

Antibióticos	CEPAS PATOGÊNICAS		
	<i>V. harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>Flexibacter maritimus</i>
<b>Enroblend</b>	2mm	9 mm	3 mm
<b>Oxiblend</b>	5mm	6 mm	4 mm
<b>Magnamicina</b>	0 mm	0 mm	7mm
<b>Eritromicina</b>	0mm	0 mm	0 mm
<b>Cepa 2</b>	8 mm	5 mm	6 mm
<b>Cepa 20</b>	7 mm	6 mm	7 mm
<b>Cepa 21</b>	9 mm	5mm	7 mm

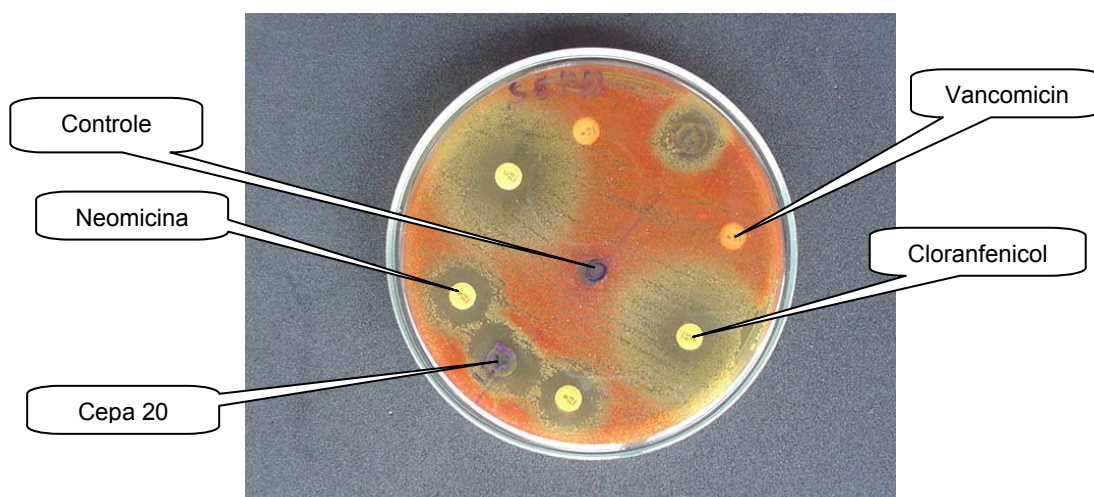


prevenção de infecções, tem potencial substituto de antibióticos, abrangendo ainda maior espectro de inibição dos patógenos.

Alguns autores como MORIARTY (2004) recomendam o uso de probióticos para a eliminação dos patógenos por competitividade evitando deste modo a resistência dos patógenos aos antibióticos. REID e BURTON (2002) evidenciaram inicialmente, em testes *in vitro*, que a capacidade dos lactobacilos em inibir o crescimento de patógenos tais como, *E. coli*, em células uropiteliais, reduzindo a infecção em animais e humanos. SUGITA et al.,(2002) sugerem que as bactérias isoladas de intestino de larvas e juvenis de linguado japonês possuem atividade antimicrobiana que pode prevenir infecções e doenças em aquicultura. Estes trabalhos confirmam a possibilidade de aplicação dos microrganismos isolados e testados neste estudo para aquicultura, especialmente com larvas de camarão.

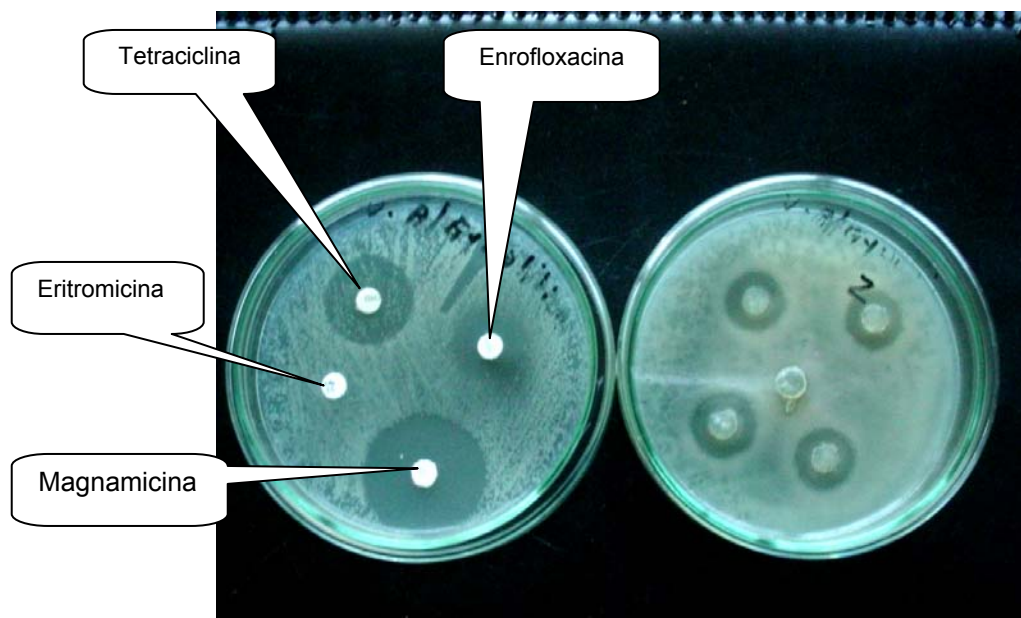
**FIGURA 21- EFEITO INIBITÓRIO DOS ANTIBIÓTICOS VANCOMICINA, CLORAMFENICOL, NEOMICINA E CEPA 20**

**FRENTE A *Serratia marcesens*.**

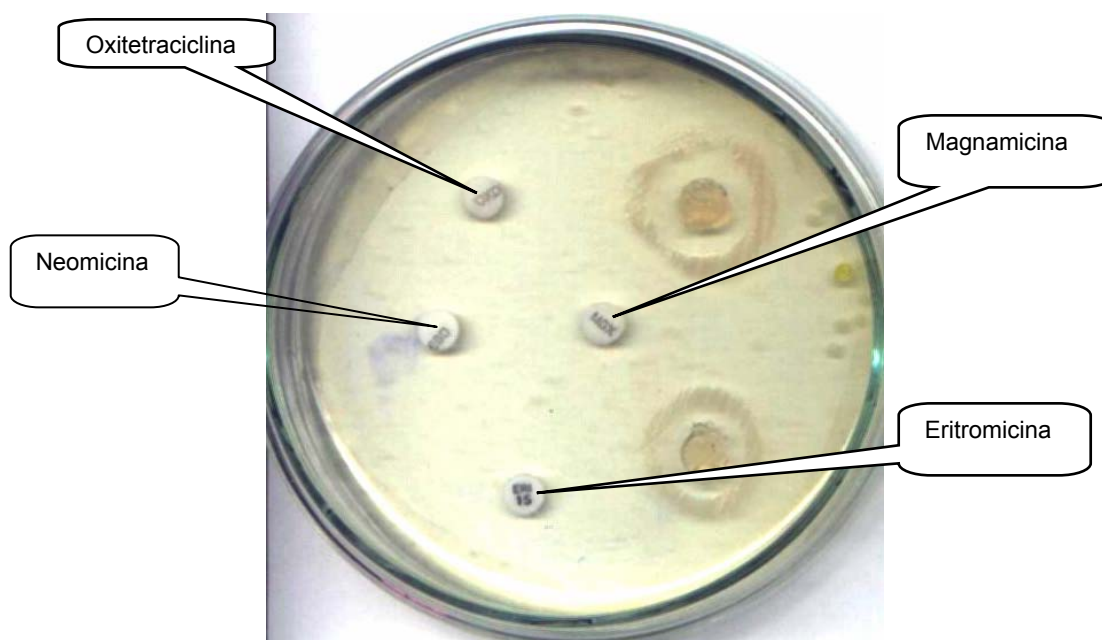




**FIGURA 22- EFEITO INIBITÓRIO DOS ANTIBIÓTICOS E A CEPA 2  
FRETE A *Vibrio alginolyticus***



**FIGURA 23- EFEITO INIBITÓRIO DOS ANTIBIÓTICOS E A CEPA 2  
FRETE A *Flexibacter maritimus***



O fato das cepas lácticas serem isoladas em lugares altamente poluídos , muito provavelmente já exerçam um poder competitivo e inibitório perante a um número amplo de patógenos em sua adaptação ao ambiente de origem.

#### 5.10 PROVAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICAÇÃO

Com a finalidade de caracterizar as melhores culturas selecionadas se procedeu a efetuar com o sistema, seguindo a metodologia descrita no item 4.2.2.9. O Quadro 16 mostra as principais características de fermentação de açúcar para identificação das cepas N<sup>o</sup> 2, 20, 21 isoladas neste estudo, conforme as provas bioquímicas.

**QUADRO 16- PRINCIPAIS CARBOIDRATOS FERMENTADOS PELAS CEPAS SELECIONADAS**

CARBOIDRATOS FERMENTADOS	CEPAS		
	21	20	2
Amigdalín	+/-	+/-	+
Arabinose	D	+	d
Celobiose	+	+	+
Esculina	+	+	+
Gluconato	-	-	+
Manitol	-	-/+	+
Melezitose	-	-	+
Melobiose	-	+	+
Raffinosa	-	+	+
Ribosa	+	+	+
Sorbitol	-	-	+
Sucrosa	+	+	+
Xylosa	-	-	-/+



De acordo com este perfil bioquímico, as cepas 21, 20 e 2 foram identificadas respectivamente como *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus sp. animalis*, pelo programa informático de probabilidade LAB PLUS software version 4.0 database da (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

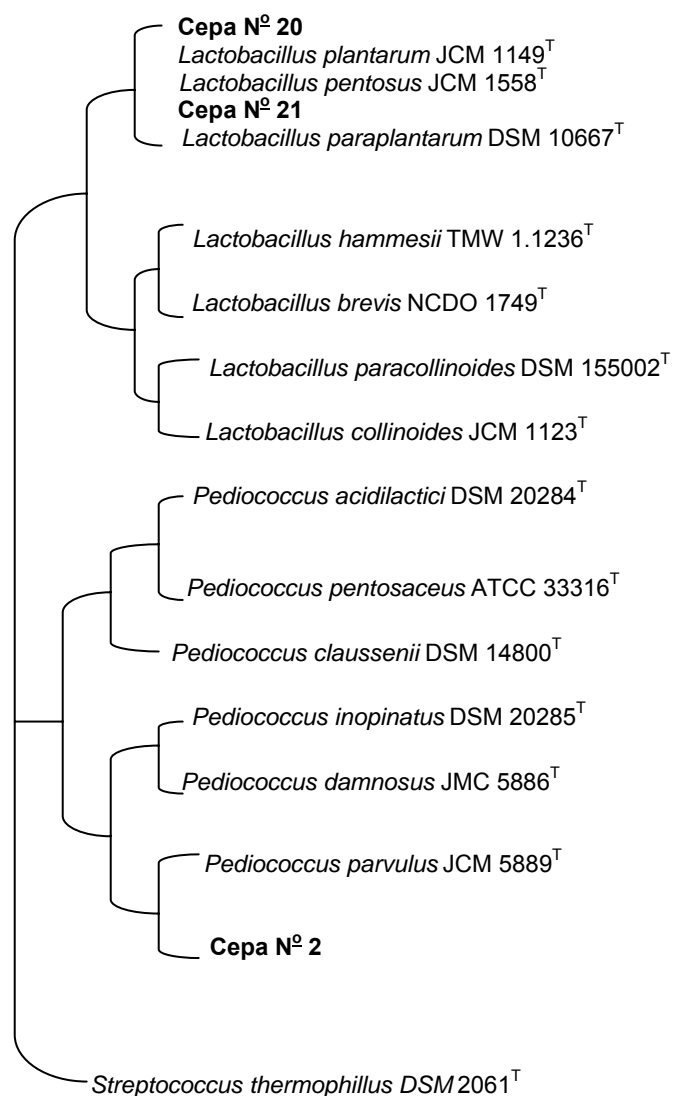
Para definir com mais certeza o gênero e espécie das cepas se procedeu a identificação molecular.

#### 5.11 IDENTIFICAÇÃO POR PCR DAS BACTÉRIAS SELECIONADAS

A identificação molecular foi efetuada segundo a metodologia descrita no item 4.2.2.10. As sequências parciais do rDNA 16S das cepas 20 e 21 apresentaram entre 99 e 100% de similaridade com sequências de rDNA 16S de linhagens de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus sp.* contidas nas bases de dados consultadas. A análise filogenética agrupou as amostras 20 e 21 com as linhagens do tipo de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paraplantarum*, não definindo a identificação destas amostras à nível de espécie. Neste caso, o gene que codifica para o rRNA 16S apresentou-se conservado, não se constituindo em um marcador adequado para diferenciação entre estas espécies. Não entanto a produção de ácidos orgânicos determinados por HPLC, indica que são cepas diferentes.

As seqüências parciais do rDNA 16S da amostra 2 apresentaram entre 98-99% de similaridade com a seqüência de rDNA 16S de amostras de *Pediococcus parvulus* contidas nas bases de dados consultadas. Estas amostras apresentaram também porcentagens de similaridade mais baixas com outras espécies de *Pediococcus*, como *P. pentosaceus*, *P. clausenii* e *P. acidilactici*. A análise filogenética (Figura 24) agrupou a cepa 2 com a linhagem tipo da espécie *Pediococcus parvulus*, confirmando os resultados de similaridade encontrados nas bases de dados de seqüência consultadas e definindo a identificação da amostra à nível de espécie.

**FIGURA 24- ÁRVORE FILOGENÉTICA DEMONSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE AS CEPAS 20, 21 E 2 COM LINHAGENS DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM BASE EM SEQÜÊNCIAS DE RNA 16S.**



## 5.12 SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO

### DE BIOMASSA

Segundo as condições e as formulações descritas no item 4.2.3, foram efetuados contagens para obtenção de viabilidade por UFC/g dos microrganismos nos diferentes meios de cultura, determinando o meio que melhor se adaptasse ao desenvolvimento dos microrganismos para produção de biomassa. Os quadros 17 e 18 mostram os resultados obtidos.

Para o teste de viabilidade nas diferentes formulações, foram selecionadas dez cepas com características desejadas e comparadas com as duas cepas de inóculos comerciais. Nos resultados obtidos foi considerada a contagem de UFC/mL na cultura de fermentação, determinação de biomassa e pH com que se finalizou a fermentação.

Meio1: A maior parte das cepas semeadas neste meio alcançaram crescimentos entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL para o substrato de fermentação, com melhores resultados para as cepas (2),(20) e 21. Por contagem viável de biomassa, foram alcançados crescimentos de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  UFC/g para as cepas (1), (2),(14),(17),(20) respectivamente e (21) com  $10^{11}$  UFC/mL. Os níveis de pH flutuaram entre 3,7 a 4,0.

Meio 2: Os níveis de crescimento neste meio se mantiveram entre  $10^9$  e  $10^{11}$  UFC/mL no substrato de fermentação inteiro. As contagens para biomassa permaneceram entre  $10^9$  a  $10^{12}$  UFC/g, sem maiores diferenças quando comparados com o meio 1. O pH final apresentou níveis mais elevados, ficando, ao final da fermentação entre 4,3 e 5,1.

Meio 3: O crescimento alcançado pelas cepas neste meio, foi entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$  UFC/mL para o substrato de fermentação inteiro. As cepas 10 e 15 obtiveram crescimentos de  $10^9$  UFC/g. A produção de biomassa viável, permaneceu entre  $10^{10}$  UFC/g e  $10^{12}$  UFC/g. O pH das fermentações atingiu níveis entre 3,9 e 4,2.

Meio 4: Os resultados de viabilidade no substrato de fermentação ou meio inteiro atingiram crescimentos de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  UFC/mL, apresentando maiores valores quando comparados com os outros meios. Para a biomassa viável, os valores alcançados oscilaram de  $10^{11}$  até  $10^{13}$  UFC/g, com valores melhores do que os anteriores. O pH final do processo atingiu de 3,7 a 4,2, muito provavelmente devido à quantidade de ácido láctico produzido durante a fermentação. As cepas comerciais de inóculo apresentaram os níveis mais elevados de pH, coincidindo com a quantidade de ácido láctico produzido quanto por serem hetero-fermentativas.

Meio 5: Os resultados obtidos neste meio alcançaram valores de viabilidade de até  $10^{10}$  UFC/mL para as cepas 1, 5, 15, 17, 20 e 25. A maior viabilidade foi da cepa 21, enquanto as restantes cepas atingiram valores entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL. Para a produção de biomassa, a maior parte das cepas apresentou valores de viabilidade entre  $10^{10}$  e  $10^{12}$  UFC/g. A cepa 21 alcançou a maior viabilidade com contagem de  $10^{13}$  UFC/g. Os resultados obtidos apresentam semelhanças com os alcançados nos meios 2 e 3.

**QUADRO 17- TESTE DE VIABILIDADE EM UFC/g E COMPORTAMENTO DO  
pH NOS MEIOS SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA**

<b>Cepa</b>	<b>Meio 1</b>	<b>Meio 2</b>	<b>Meio 3</b>	<b>Meio 4</b>	<b>Meio 5</b>
<b>C210-3 AMM (1)</b>	Meio líquido: 2,0X 10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 4,3X 10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 3,8	Meio líquido: 5,0X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 6,2X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 4,9	Meio líquido: 1,6X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 2,4X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,14	Meio líquido: 7,0X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 6,4X10 <sup>11</sup> pH inicial: 5,9 pH final: 3,7	Meio líquido: 3,8 x 10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 10,0 x 10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,17
<b>C210-2 AZOM (2)</b>	Meio líquido: 3,8X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 2,3X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 4,0	Meio líquido: 3,2X10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 4,4X10 <sup>9</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 4,3	Meio líquido: 2,0X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 5,0X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,1	Meio líquido: 2,0X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 4,1X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 3,9	Meio líquido: 7,2 x 10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 10,0 x 10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,30
<b>1OSB (5)</b>	Meio líquido: 1,3X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 4,3X10 <sup>9</sup> /g pH inicial:5,8 pH final: 3,9	Meio líquido: 4,1X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 6,4X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 5,1	Meio líquido: 9,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 2,4X10 <sup>12</sup> /g pH inicial:5,9 pH final:4,2	Meio líquido: 2,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 3,1X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 3,7	Meio líquido: 5,2 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 9,0 x 10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,16
<b>1DMS (10)</b>	Meio líquido: 1,6X10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 3,1X10 <sup>9</sup> /g pH inicial:5,8 pH final: 3,9	Meio líquido: 4,2X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 3,4X10 <sup>12</sup> /g pH inicial:6,0 pH final: 4,5	Meio líquido: 8,4X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 6,4X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final : 3,9	Meio líquido: 1,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 2,4X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 3,9	Meio líquido: 3,8 x 10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 1,6 x 10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,15
<b>J810-1 AZOP (12)</b>	Meio líquido: 4,2X10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 4,0X10 <sup>9</sup> /g pH inicial:5,8 pH final: 3,8	Meio líquido: 2,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 1,4X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 5,11	Meio líquido: 6,3X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 4,4X10 <sup>12</sup> PH inicial: 5,9 pH final: 4,0	Meio líquido: 4,0X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 6,4X10 <sup>11</sup> /g pH inicial:5,9 pH final: 3,8	Meio líquido: 6,0 X 10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 1,6 x 10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,20
<b>J810-1-1 (14)</b>	Meio líquido: 3,1X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 5,1X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final:3,8	Meio líquido: 3,8X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 1,2X10 <sup>12</sup> /g pH inicial:6,0 pH final: 4,4	Meio líquido: 3,1X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 8,4X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 3,9	Meio líquido: 4,0X10 <sup>12</sup> /mL Biomassa: 5,2X10 <sup>13</sup> /g pH inicial 5,9 pH final: 4,1	Meio líquido: 3,4 x 10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 3,0 x 10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,13
<b>BC2 10-2 AZOM A (15)</b>	Meio líquido: 2,0X10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 9,4X10 <sup>9</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final 3,7	Meio líquido: 3,3X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 5,2X10 <sup>12</sup> /g pH inicial:6,0 pH final: 4,7	Meio líquido: 2,0X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 6,1X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final:4,2	Meio líquido: 2,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 9,0X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,1	Meio líquido: 6,0 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 2,2 x 10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,17
<b>CAR 10-3 (17)</b>	Meio líquido: 3,0X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 5,2X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 3,7	Meio líquido: 3,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 7,2X10 <sup>12</sup> /g PH inicial: 6,0 PH final: 4,7	Meio líquido: 2,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 6,2X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,1	Meio líquido: 4,4X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 7,0X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 3,8	Meio líquido: 4,0 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 7,2 x 10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,27
<b>(20)</b>	Meio líquido: 3,3X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 8,4X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 3,7	Meio líquido: 3,3X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 6,4X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 4,7	Meio líquido: 5,0X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 7,3X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,2	Meio líquido: 9,0X10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 5,0X10 <sup>12</sup> /g pH inicial:5,9 pH final: 3,8	Meio líquido: 4,0 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 6,2 x 10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,3

**QUADRO 18- TESTE DE VIABILIDADE EM UFC/g E COMPORTAMENTO DO pH NOS MEIOS SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA**

<b>Cepa</b>	<b>Meio No1</b>	<b>Meio No 2</b>	<b>Meio No3</b>	<b>Meio No4</b>	<b>Meio No5</b>
<b>(21)</b>	Meio líquido: 8,4X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 6,2X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 3,8	Meio líquido: 3,5X10 <sup>9</sup> /mL Biomassa: 5,4X10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 4,7	Meio líquido: 1,3X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 4,4X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,1	Meio líquido: 5,2X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 6,0X10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 3,8	Meio líquido: 5,2 x 10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 2,4 x 10 <sup>13</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,20
<b>Cepa comercial (24)</b>	Meio líquido: 7,8 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 9,1 x 10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 4,1	Meio líquido: 4,2 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 3,5 x 10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 4,7	Meio líquido: 8,0 x 10 <sup>11</sup> /mL Biomassa: 5,1 x 10 <sup>13</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,2	Meio líquido: 2,1X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 3,2X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,2	Meio líquido: 1,2 x 10 <sup>8</sup> /mL Biomassa: 3,3 x 10 <sup>10</sup> /g pH inicial: 6,36 pH final: 4,28
<b>Cepa comercial (25)</b>	Meio líquido: 3,0 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 3,1 x 10 <sup>11</sup> /g pH inicial: 5,8 pH final: 4,34	Meio líquido: 3,2 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 5,1 x 10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 6,0 pH final: 4,8	Meio líquido: 8,0 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 5,1 x 10 <sup>13</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,8	Meio líquido: 7,4X10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 8,1X10 <sup>12</sup> /g pH inicial: 5,9 pH final: 4,2	Meio líquido: 3,2 x 10 <sup>10</sup> /mL Biomassa: 5,0 x 10 <sup>11</sup> pH inicial: 6,36 pH final: 4,6

A concentração celular alcançada nos ensaios é considerada ótima de acordo com o recomendado para produção de biomassa por (ROISSART *et al.*, (1994), e HANSEN (1999) de 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> UFC/g. O meio 4 conferiu um nível maior de viabilidade com 10<sup>13</sup> UFC/g com a cepa 14 e com índices de viabilidade aceitáveis para todas as cepas, de 10<sup>12-11</sup>UFC/g.

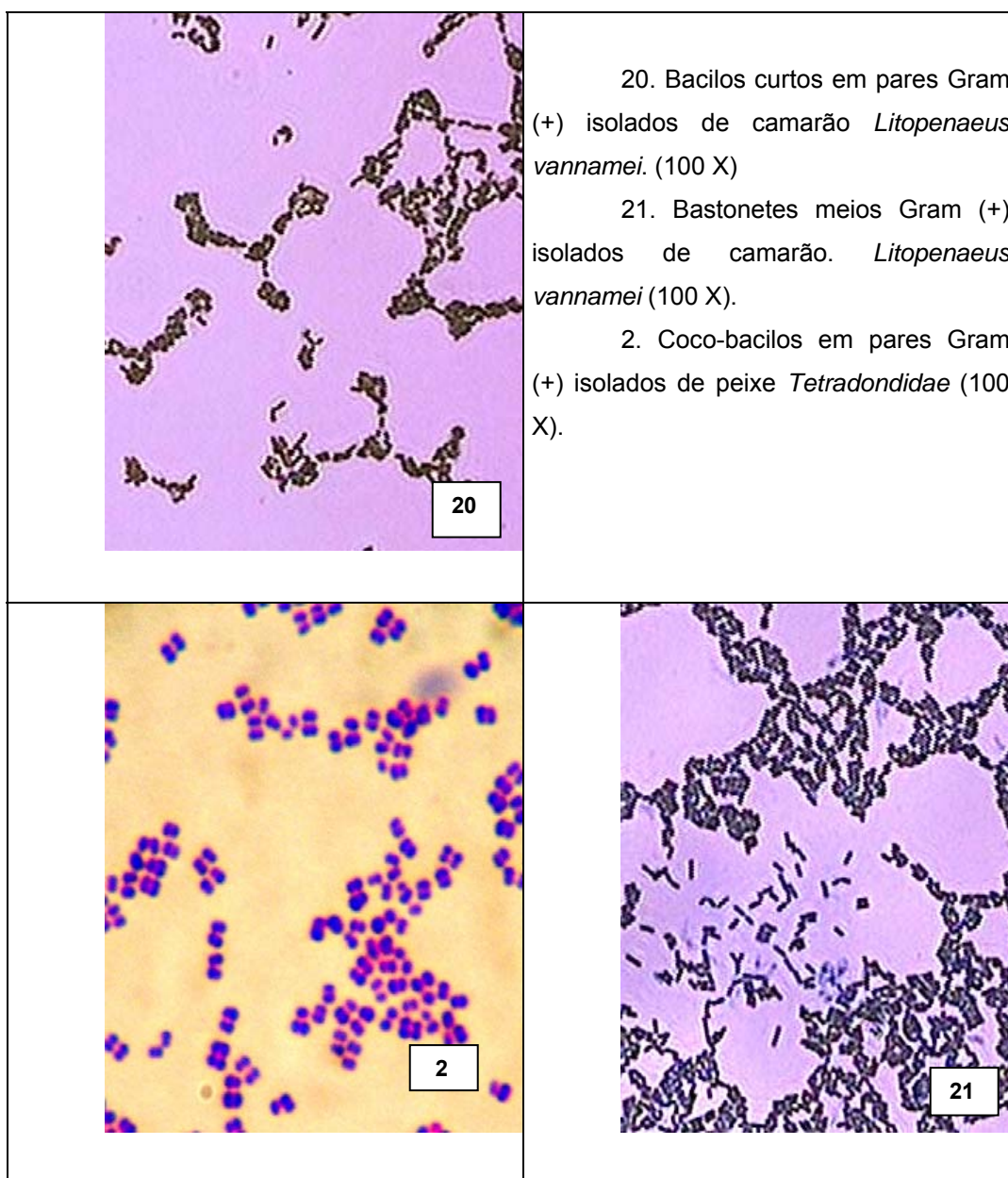
As bactérias lácticas se desenvolveram consideravelmente em todos os meios testados. A concentração em biomassa foi maior do que a do material do sobrenadante; geralmente com um a duas casas decimais acima em todos os ensaios.

Considerando os resultados obtidos e a facilidade de obtenção da matéria prima para elaboração dos inóculos, foram selecionados os meios 3, 4 e 5 para efetuar com eles os estudos de cinética de crescimento bacteriano. Foram selecionadas as cepas 20, 21 e 2 isoladas no estudo e as cepas 24 e 25 isoladas do inóculo comercial. Nas figuras 25 e 26 pode-se observar a morfologia das cepas selecionadas desenvolvidas em meio MRS.

### 5.13 CINÉTICAS DE FERMENTAÇÃO

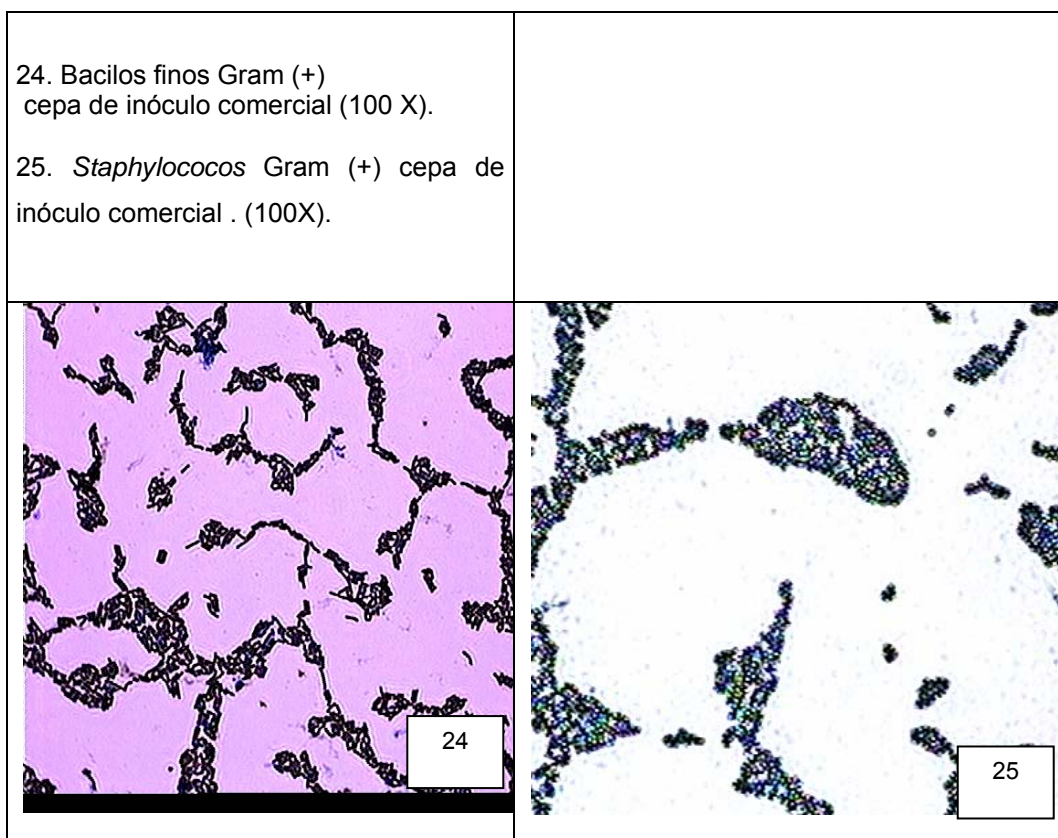
Segundo as técnicas e condições descritas no item 5.14 foram efetuadas as cinéticas com as cepas isoladas selecionadas 2, 20 e 21 e as cepas isoladas de inóculo comercial 24 e 25, (Figuras 25 e 26) testandolas para os três meios que apresentaram a melhor produção de biomassa. Foram efetuadas 15 cinéticas por duplicata, para um total de 30. Os resultados obtidos para os parâmetros estabelecidos se mostram nos quadros 19, 21, 23, 25 e 27. Estes representam uma média dos resultados obtidos.

**FIGURA 25- MORFOLOGIA DAS CEPAS 20, 21 E 2 SELECIONADAS  
NO ESTUDO COM AS QUE SE EFETUARAM AS CINÉTICAS PARA ESTUDO  
DE CRESCIMENTO**





**FIGURA 26- MORFOLOGIA DAS CEPAS ISOLADAS DE INÓCULO  
COMERCIAL TESTADAS COMO COMPARAÇÃO**



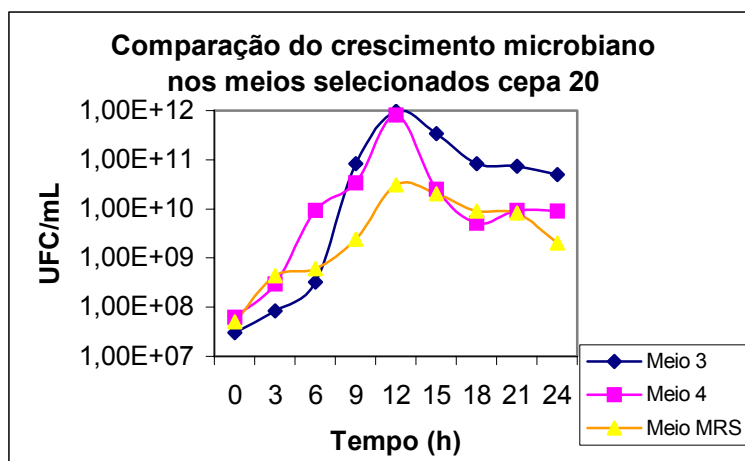
#### 5.13.1 Cinética comparativa da cepa 20

Os resultados obtidos para as cinéticas efetuadas para os três meios selecionados, estão indicados nos quadros 19 e 20 como também no Gráfico 1.

### QUADRO 19- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 20 NOS MEIOS SELECIONADOS

Temp o horas	CEPA 20 MEIO 3				CEPA 20 MEIO 4				CEPA 20 MEIO (MRS)			
	pH	UFC/mL	Açuc. Total g/L	HPLC Láctico g/L	pH	UFC/ mL	Açuc. Total g/L	HPC Lácti -co g/L	pH	UFC/mL	Açuc. Total g/L	HPLC Láctico g/L
T-0	6,2	-----	-----	-----	6,5	-----	26,4	----	6,2	-----	20,1	-----
T0	5,1	$3,0 \times 10^7$	20,1	1,4	5,3	$6,2 \times 10^7$	24,2	4,14	5,2	$5,0 \times 10^7$	17,3	2,37
T1 (3h)	4,4	$8,4 \times 10^7$	19,0	2,1	5,0	$3,0 \times 10^8$	23,6	9,0	5,0	$4,4 \times 10^8$	17,2	3,2
T2 (6h)	4,1	$3,2 \times 10^8$	16,5	7,0	4,1	$9,03 \times 10^9$	20,9	12,6	4,2	$6,0 \times 10^8$	13,0	7,9
T3 (9h)	4,0	$8,2 \times 10^{10}$	15,2	7,1	4,0	$3,4 \times 10^{10}$	19,3	12,8	4,1	$2,4 \times 10^9$	12,1	14,2
T4 (12h)	4,0	$9,6 \times 10^{11}$	14,9	7,8	4,0	$8,2 \times 10^{11}$	18,5	13,6	4,1	$3,1 \times 10^{10}$	11,1	14,2
T5 (15h)	4,0	$3,4 \times 10^{11}$	13,6	8,6	4,0	$2,5 \times 10^{10}$	18,5	14,3	3,9	$2,0 \times 10^{10}$	10,2	16,1
T6 (18h)	4,0	$8,3 \times 10^{10}$	11,8	13,0	3,9	$5,1 \times 10^9$	16,1	13,4	3,9	$9,1 \times 10^9$	9,2	17,2
T7 (21h)	3,9	$7,4 \times 10^{10}$	9,1	18,8	3,9	$9,2 \times 10^9$	15,5	13,2	3,9	$2,0 \times 10^{10}$	9,0	18,6
T8 (24h)	3,9	$5,0 \times 10^{10}$	8,31	19,0	3,9	$9,0 \times 10^9$	15,1	13,3	3,9	$8,2 \times 10^9$	8,4	20,5

### GRÁFICO 1- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 20 NOS MEIOS SELECIONADOS



**QUADRO 20- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA  
CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 20**

<b>Cepa 20</b>	<b>Meio 3</b>	<b>Meio 4</b>	<b>Meio MRS</b>
<b>Fase lag (h)</b>	3	3	0
<b>Velocidade específica de crescimento (<math>\mu h^{-1}</math>)</b>	0,92	0,79	0,49
<b>Fim da fase logarítmica (Horas)</b>	12	12	12
<b>Tempo de duplicação em (minutos)</b>	45	52	84
<b>Incremento total celular( UFC/mL)</b>	$5,0 \times 10^{10}$	$8.94 \times 10^9$	$8.15 \times 10^9$
<b>Incremento celular ao fim da fase logarítmica (UFC/mL)</b>	$9.6 \times 10^{11}$	$8.2 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{10}$
<b>Açúcar total consumido (g/L)</b>	11,8	11,3	11,7
<b>Açúcar total consumido ao fim da fase logarítmica (g/L)</b>	6,6	3,4	2,7
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9214	0,983	0,943

Os resultados indicam que o melhor crescimento foi obtido com os meios 3 e 4 com 12 horas de processo e com um incremento celular de  $9,6^{11}$ UFC/mL e  $8,2^{11}$ UFC/mL, respectivamente durante a fase exponencial, indicando que o tempo mínimo de duração do processo fermentativo com utilização destes meios é de 12 horas.

O meio 5, (meio comercial), apresentou uma leve desvantagem quando comparado com os meios anteriores. Os meios formulados para substituição do meio comercial podem competir favoravelmente para o desenvolvimento deste microrganismo. De acordo com os resultados obtidos, o coeficiente R<sup>2</sup> mais elevado, (0,983) foi correspondente ao meio 4, coincidindo com o maior incremento celular total. É por tanto mais importante atingir no menor tempo possível o maior incremento celular num processo fermentativo industrial.

A porcentagem de açúcar total consumida durante o processo de crescimento celular se encontra em média de 55% para as formulações 3 e 5. O meio 4 apresentou o menor consumo de açúcar total para propiciar o crescimento microbiano atingido, podendo ser pela composição das formulações, ricas inicialmente em açúcar glicose e sacarose.

A formulação 4, além da sacarose, é rica em lactose devido ao colostro bovino que faz parte de sua composição. O valor mínimo para o pH foi de 3,9 para todos os meios ao final da fermentação, permanecendo cerca de 4,0 após 12 horas quando alcançou a fase máxima de crescimento logarítmico.

A produção de ácido láctico foi curiosamente, menor com a formulação 4 preparada com colostro bovino, o que pode estar indicando que os microrganismos não utilizaram a lactose presente no substrato para produção de ácido láctico de forma eficiente, ou o substrato não é o mais apropriado para a produção deste metabolito.

#### 5.13.2 Cinética comparativa da cepa 21

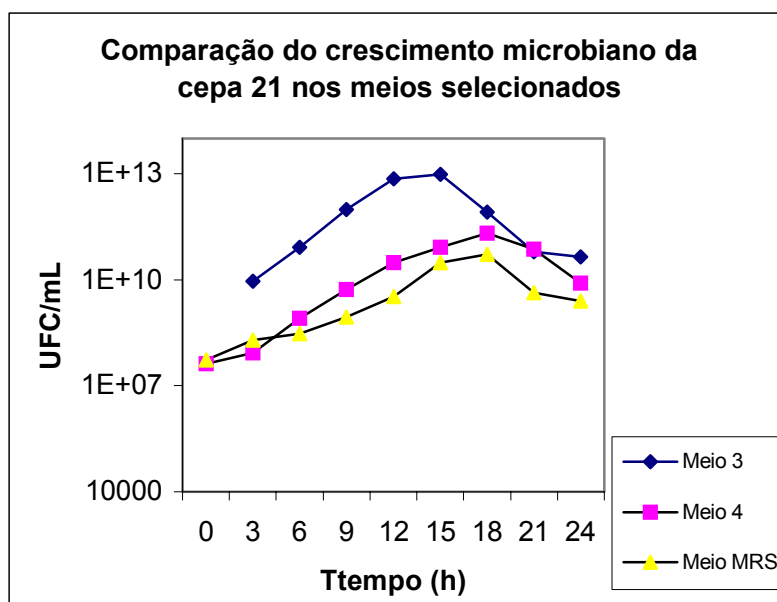
Os resultados obtidos indicam que a cepa 21 apresenta melhor crescimento no meio 3, chegando no fim da fase logarítmica com  $9,8 \times 10^{12}$  UFC/mL, com vantagem de duas a três casas decimais em relação ao crescimento nos meios 4 e 5. No meio 3 se obteve o menor tempo (15 horas) para alcançar a fase máxima de crescimento, diferente dos outros dos meios com 18 horas. Nos quadros 21 e 22 e no Gráfico 2 podem ser observados estes resultados comparativamente.

## QUADRO 21- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 21 NOS MEIOS SELECIONADOS

Temp o horas	CEPA 21 MEIO 3				CEPA 21 MEIO 4				CEPA 21 MEIO (MRS)			
	pH	UFC/mL	Açuc. Total g/L	HPLC Láctico g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPC Lácti g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctico g/L
T-0	6,2	-----	26,2	-----	6,5	-----	26,2	-----	6,2	-----	20,1	-----
T0	5,5	$6,8 \times 10^8$	25,4	1,65	5,4	$4,2 \times 10^7$	25,1	2,6	5,7	$5,3 \times 10^7$	17,0	3,6
T1 3h	5,0	$9,2 \times 10^9$	24,3	2,5	4,6	$8,4 \times 10^7$	24,6	6,2	5,1	$2,0 \times 10^8$	16,94	8,3
T2 (6h)	4,4	$8,4 \times 10^{10}$	23,6	9,8	4,2	$8,1 \times 10^8$	23,5	11,3	4,3	$3,0 \times 10^8$	14,10	12,2
T3 (9h)	4,2	$9,6 \times 10^{11}$	21,2	12,1	4,2	$5,4 \times 10^9$	21,2	12,4	4,0	$9,0 \times 10^8$	13,3	15,8
T4 (12h)	4,1	$7,3 \times 10^{12}$	19,3	13,7	4,1	$3,1 \times 10^{10}$	20,5	13,0	4,0	$3,4 \times 10^9$	12,2	17,6
T5 (15h)	4,0	$9,8 \times 10^{12}$	16,6	14,0	4,0	$8,2 \times 10^{10}$	18,6	13,4	3,9	$3,0 \times 10^9$	10,1	18,0
T6 (18h)	4,0	$8,0 \times 10^{11}$	15,4	14,3	4,0	$2,1 \times 10^{11}$	17,1	14,2	3,9	$5,2 \times 10^{10}$	10,1	18,0
T7 (21h)	4,0	$6,2 \times 10^{10}$	14,1	14,4	3,8	$7,4 \times 10^{10}$	15,4	15,3	3,8	$4,3 \times 10^9$	8,9	18,6
T8 (24h)	4,0	$4,4 \times 10^{10}$	13,7	15,0	3,7	$8,2 \times 10^9$	14,0	16,0	3,8	$2,5 \times 10^9$	8,0	19,2

A velocidade específica de crescimento ( $\mu \text{ h}^{-1}$  máxima) foi maior no meio 3 (1,16) com vantagem considerável em relação ao meios 4 e 5 com valores de 0,51, indicando que esta cepa no meio 3 apresenta condições mais favoráveis para crescimento e produção de biomassa.

**GRÁFICO 2- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 21  
NOS MEIOS SELECIONADOS**



**QUADRO 22- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA  
CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 21**

Cepa 21	Meio 3	Meio 4	Meio MRS
Fase lag	0	3	0
Velocidade específica de crescimento ( $\mu h^{-1}$ )	1,16	0,51	0,52
Fim da fase logarítmica (Horas)	15	18	18
Tempo de duplicação em (minutos)	36	81	80
Incremento total celular (UFC/mL)	$5.0 \times 10^{10}$	$8.2 \times 10^9$	$2.5 \times 10^9$
Incremento celular ao fim da fase logarítmica (UFC/mL)	$9.4 \times 10^{12}$	$2.10 \times 10^{11}$	$5.2 \times 10^{10}$
Açúcar total consumido (g/L)	12,5	12,2	12,1
Açúcar total consumido ao fim da fase logarítmica (g/L)	2,9	4,6	4,2
$R^2$	0,97	0,98	0,94

### 5.13.3 Cinética comparativa cepa 2

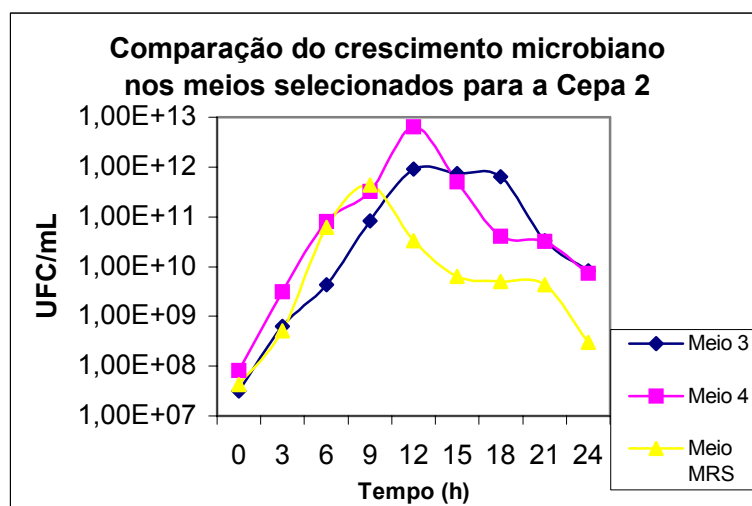
Os resultados obtidos na cinética de crescimento desta cepa são apresentados no Quadro 23. Com os meios selecionados, se mostrou que as formulações 3 e 4 alcançaram o máximo crescimento às 12 horas do processo, com  $3,0 \times 10^{12}$  UFC/mL e  $6,4 \times 10^{12}$  UFC/mL, respectivamente, com uma leve vantagem para o meio 4. O maior valor da  $\mu h^{-1}$  máxima de crescimento foi obtido para o meio 4 com 0,91, segundo para o meio 3 com 0,84 e o meio 5 com menor valor apresentado.

Com estes resultados se confirma que os meios selecionados para a produção de biomassa apresentaram melhor comportamento para crescimento microbiano que o meio comercial 5. O Gráfico 3 e o Quadro 23 apresentam os resultados mencionados.

**QUADRO 23- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 2 NOS MEIOS SELECIONADOS**

Tempo horas	CEPA 2 MEIO 3				CEPA 2 MEIO 4				CEPA 2 MEIO (MRS)			
	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctic g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctic g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctic g/L
T-0	6,4	-----	23,8	-----	6,4	-----	31,4	-----	6,2	-----	21,0	-----
T0	5,0	$3,2 \times 10^7$	22,2	3,0	5,0	$8,2 \times 10^7$	29,4	2,4	5,4	$4,2 \times 10^7$	20,0	3,1
T1 (3h)	4,3	$6,2 \times 10^8$	21,4	5,0	5,0	$3,1 \times 10^9$	27,0	6,2	5,1	$5,1 \times 10^8$	18,4	5,2
T2 6h	3,7	$4,3 \times 10^9$	20,2	6,5	4,0	$8,0 \times 10^{10}$	23,5	7,1	4,3	$6,2 \times 10^{10}$	10,0	8,1
T3 (9h)	3,5	$8,2 \times 10^{10}$	19,1	6,4	4,0	$3,2 \times 10^{11}$	19,6	8,1	4,0	$4,4 \times 10^{11}$	6,4	11,2
T4 (12h)	3,4	$9,0 \times 10^{11}$	19,0	8,0	3,5	$6,4 \times 10^{12}$	18,8	9,5	4,0	$3,3 \times 10^{10}$	4,4	12,3
T5 (15h)	3,4	$7,4 \times 10^{11}$	18,10	8,3	3,5	$5,0 \times 10^{11}$	18,1	11,2	3,8	$6,3 \times 10^9$	4,0	12,4
T6 (18h)	3,4	$6,4 \times 10^{11}$	16,1	9,0	3,5	$4,1 \times 10^{10}$	17,1	13,0	3,8	$5,0 \times 10^9$	3,5	13,0
T7 (21h)	3,3	$3,3 \times 10^{10}$	13,4	10,3	3,4	$3,2 \times 10^{10}$	16,2	15,0	3,8	$4,3 \times 10^9$	3,3	14,3
T8 (24 h)	3,3	$6,2 \times 10^9$	10,4	10,6	3,3	$7,4 \times 10^9$	14,5	15,4	3,7	$3,0 \times 10^8$	2,2	15,0

### GRÁFICO 3- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 2 NOS MEIOS SELECIONADOS



Os resultados de comparação dos dados cinéticos da cepa 2 nas diferentes formulações, podem ser observados no Quadro 24.

### QUADRO 24- COMPARAÇÃO DE DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 2

Cepa 2	Meio 3	Meio 4	Meio MRS
Fase lag	0	0	0
Velocidade específica de crescimento ( $\mu h^{-1}$ )	0,84	0,91	0,53
Fim da fase logarítmica (Horas)	12	12	9
Tempo de duplicação em (minutos)	50	46	78
Incremento total celular (UFC/mL)	$6.17 \times 10^9$	$7.32 \times 10^{12}$	$2.58 \times 10^9$
Incremento celular ao fim da fase logarítmica (UFC/mL)	$9,0 \times 10^{11}$	$6.4 \times 10^{12}$	$4.4 \times 10^{11}$
Açúcar total consumido (g/L)	11,8	14,9	17,8
Açúcar total consumido ao fim da fase logarítmica (g/L)	2,4	10,6	13,6
$R^2$	0.99	0.98	0.97



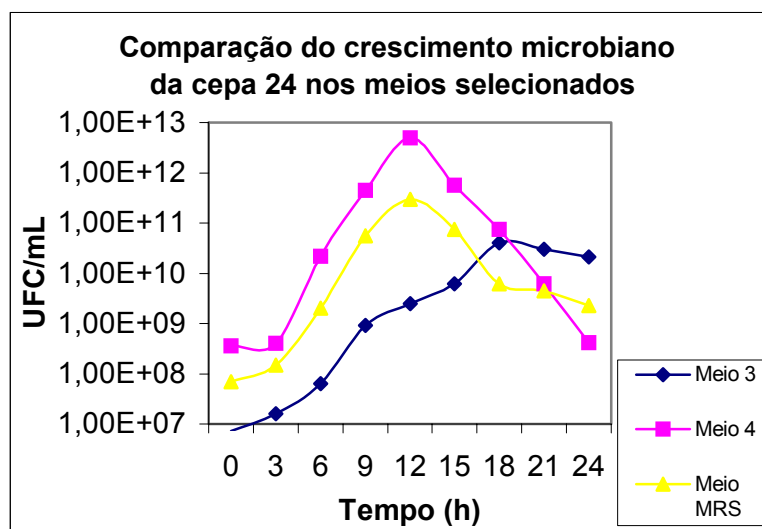
#### 5.13.4 Cinética comparativa da cepa 24

O Quadro 25 mostra os resultados obtidos para esta cinética com os três meios. O Gráfico 4 mostra o comportamento da cinética de crescimento. Com a cepa 24 os melhores crescimentos se apresentaram com os meios 4 e 5 às 12 horas de processo, com formação de células entre  $4,0 \times 10^{12}$  UFC/mL e  $3,0 \times 10^{11}$  UFC/mL respectivamente, apresentando uma vantagem com respeito ao meio 3, demonstrando que esta cepa teve um maior aproveitamento da formulação dos meios 4 e 5.

**QUADRO 25- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 24  
NOS MEIOS SELECIONADOS**

Tempo (horas)	CEPA 24 MEIO 3				CEPA 24 MEIO 4				CEPA 24 MEIO (MRS)			
	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctic. g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctic. g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctico g/L
T-0	6,1	-----	24,7	-----	6,1	-----	31,3	-----	6,2	-----	21,4	-----
T0	5,3	$7,2 \times 10^6$	23,2	2,5	5,0	$3,6 \times 10^8$	29,0	3,3	6,	$7,0 \times 10^7$	20,2	0,5
T1 (3h)	5,0	$1,6 \times 10^7$	23,4	6,2	5,0	$4,0 \times 10^8$	23,0	4,4	5,2	$1,5 \times 10^8$	18,5	5,0
T2 (6h)	4,4	$6,3 \times 10^7$	20,4	13,2	4,2	$2,2 \times 10^{10}$	18,0	7,6	4,4	$2,0 \times 10^9$	16,8	10,1
T3 (9h)	4,2	$9,2 \times 10^7$	19,3	13,8	4,0	$4,4 \times 10^{11}$	18,0	9,5	4,3	$5,6 \times 10^{10}$	15,6	10,4
T4 (12h)	4,1	$2,5 \times 10^9$	16,2	14,5	4,0	$4,0 \times 10^{12}$	14,6	11,2	4,2	$3,0 \times 10^{11}$	14,6	13,4
T5 (15h)	4,0	$6,1 \times 10^9$	15,6	14,8	4,0	$5,6 \times 10^{11}$	13,0	11,3	4,	$7,4 \times 10^{10}$	13,2	13,6
T6 (18h)	4,0	$4,0 \times 10^{10}$	15,3	15,4	3,8	$7,4 \times 10^{10}$	11,4	11,6	4,0	$6,2 \times 10^9$	10,3	14,2
T7 (21h)	4,0	$3,0 \times 10^{10}$	15,0	16,2	3,8	$8,2 \times 10^9$	11,4	12,3	4,0	$4,5 \times 10^9$	8,2	16,1
T8 (24h)	4,0	$2,1 \times 10^{10}$	14,3	17,0	3,8	$4,2 \times 10^8$	11,0	13,0	4,0	$2,3 \times 10^9$	6,0	18,0

#### GRÁFICO 4- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 24 NOS MEIOS SELECIONADOS



No Quadro 26 são mostrados os resultados do cálculo cinético obtido com a cepa 24 nos meios selecionados. O maior valor para a  $\mu \text{ h}^{-1}$  de crescimento foi no meio 4, com 0,648, indicando o crescimento maior em menor tempo, quando comparado com os outros meios selecionados.

**QUADRO 26- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO NOS MEIOS SELECIONADOS COM A CEPA 24**

<b>Cepa 24</b>	<b>Meio 3</b>	<b>Meio 4</b>	<b>Meio MRS</b>
<b>Fase lag</b>	0	0	0
<b>Velocidade específica de crescimento (<math>\mu h^{-1}</math>)</b>	0,49	0,65	0,58
<b>Fim da fase logarítmica (Horas)</b>	18	12	12
<b>Tempo de duplicação em minutos</b>	85	64	72
<b>Incremento total celular (UFC/mL)</b>	$2,1 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^7$	$2,2 \times 10^9$
<b>Incremento celular ao fim da fase logarítmica (UFC/mL)</b>	$4,0 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^{11}$	$7,4 \times 10^{10}$
<b>Açúcar total consumido (g/L)</b>	10,4	18	14,2
<b>Açúcar total consumido ao fim da fase logarítmica (g/L)</b>	8,1	16	7
<b>R<sup>2</sup></b>	0,981	0,8291	0,8676

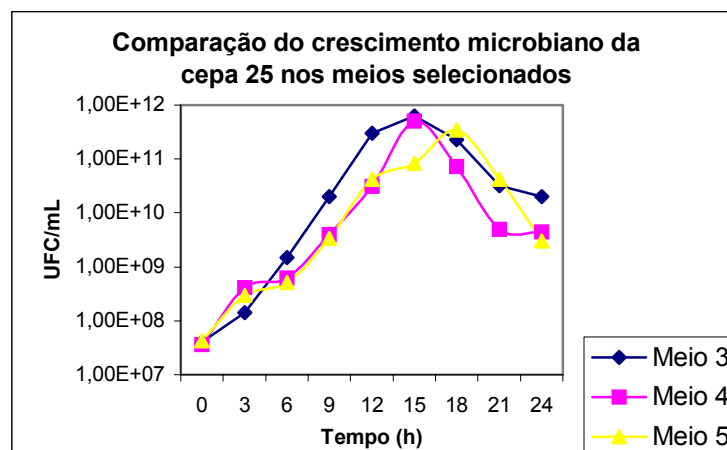
#### 5.13.5 Cinética comparativa da cepa 25

Os resultados obtidos para a cinética da cepa isolada de inóculo comercial 25 são apresentados nos quadros 27, 28 e o Gráfico 5 demonstra a evolução do crescimento microbiano para os meios selecionados com a cepa 25.

## QUADRO 27- RESULTADOS DA CINÉTICA COMPARATIVA DA CEPA 25 NOS MEIOS SELECIONADOS

Tempo horas	CEPA 25 MEIO 3				CEPA 25 MEIO 4				CEPA 25 MEIO (MRS)			
	pH	UFC/mL	Açuc Tot. g/L	HPLC Láctic. g/L	pH	UFC/mL	Açuc Tot. g/L	HPC Láctic. g/L	pH	UFC/mL	Açuc Total g/L	HPLC Láctic. g/L
T-0	6,3	-----	22,7	-----	6,1	-----	27,6	-----	6,1	-----	20,1	-----
T0	5,0	$4,0 \times 10^7$	22,3	2,0	6,07	$3,6 \times 10^7$	25,9	3,3	5,5	$4,3 \times 10^7$	18,1	2,0
T1 (3h)	4,8	$1,4 \times 10^8$	20,0	5,0	5,06	$4,1 \times 10^8$	23,1	3,8	5,3	$3,0 \times 10^8$	13,1	2,2
T2 (6h)	4,5	$1,5 \times 10^9$	19,6	2,3	4,47	$6,2 \times 10^8$	21,1	5,1	4,4	$5,2 \times 10^8$	11,4	4,3
T3 (9h)	4,2	$2,0 \times 10^{10}$	19,2	2,8	4,24	$4,0 \times 10^9$	17,8	7,0	4,3	$3,4 \times 10^9$	11,9	6,7
T4 (12h)	4,1	$3,0 \times 10^{11}$	18,5	2,9	4,06	$3,1 \times 10^{10}$	17,3	7,8	4,2	$4,2 \times 10^{10}$	7,9	7,1
T5 (15h)	4,1	$6,2 \times 10^{11}$	17,2	3,2	3,96	$5,0 \times 10^{11}$	16,8	8,0	4,1	$8,4 \times 10^{10}$	6,0	9,7
T6 (18h)	4,1	$2,3 \times 10^{11}$	17,0	3,2	3,86	$7,2 \times 10^{10}$	14,6	10,8	4,0	$3,4 \times 10^{11}$	5,9	10,2
T7 (21h)	4,1	$3,2 \times 10^{10}$	16,2	3,5	3,84	$5,0 \times 10^9$	13,4	12,7	3,9	$4,2 \times 10^{10}$	5,7	12,8
T8 (24 h)	4,0	$2,0 \times 10^{10}$	14,7	3,9	3,75	$4,4 \times 10^9$	12,6	13,7	3,8	$3,0 \times 10^9$	5,7	13,5

## GRÁFICO 5- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO A CEPA 25 NOS MEIOS SELECIONADOS



**QUADRO 28- COMPARAÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA CRESCIMENTO MICROBIANO DA CEPA 25 NOS MEIOS SELECIONADOS**

<b>Cepa 25</b>	<b>Meio 3</b>	<b>Meio 4</b>	<b>Meio MRS</b>
<b>Fase lag.</b>	0	0	0
<b>Velocidade específica de crescimento (<math>\mu h^{-1}</math>)</b>	0,70	0,60	0,51
<b>Fim da fase logarítmica (horas)</b>	15	15	18
<b>Tempo de duplicação em minutos</b>	59	69	82
<b>Incremento total celular (UFC/mL)</b>	$2,0 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
<b>Incremento celular ao fim da fase logarítmica (UFC/mL)</b>	$6,2 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{11}$	$3,4 \times 10^{11}$
<b>Açúcar total consumido (g/L)</b>	7,6	10,5	12,4
<b>Açúcar total consumido ao fim da fase logarítmica (g/L)</b>	5,1	6,3	12,2
<b>Rr<sup>2</sup></b>	0,9812	0,9681	0,9823

O comportamento desta cepa nos três meios foi similar, sendo o meio 3 o que apresentou uma diferença levemente maior em relação aos outros meios em quanto ao número de células viáveis e incremento celular durante a fase logarítmica e o valor da  $\mu h^{-1}$  de crescimento. Em geral, os valores obtidos para os cálculos da cinética indicam que qualquer um dos três meios pode ser utilizado para elaboração de inóculo com esta cepa.

Pode-se dizer que os resultados obtidos nas cinéticas com os meios selecionados, o meio 3 é o mais adequado para a elaboração dos inóculos, já que em quase todos os processos de fermentação com as diferentes cepas alcançou a maior  $\mu^{h-1}$  (Quadros 20, 22, 24, 26, e 28), excetuando o caso do meio 4 com a cepa 2 (Quadro 24) e a cepa comercial 24 no meio 4 (Quadro 26) apresentando uma similaridade com os resultados obtidos para a cinética da cepa 2, onde o incremento celular na fase logarítmica no meio 4 foi o maior alcançado em relação aos meios restantes (Quadro 24). No caso do açúcar total consumido pelas cepas selecionadas nas diferentes formulações, a formulação comercial 5 apresentou valores maiores ou próximos dos das cinéticas das cepas 20 e 21 com valores de 11,8, 11,3 e 11,7 g/L; para a cepa 20 e 12,5, 12,2 e 12,1 g/L para a cinética da cepa 21. Quanto à produção de ácido láctico, as formulações propostas para substituição de crescimento celular não foram as melhores para produção de ácido láctico. A formulação comercial ou meio 5 obteve maiores valores de ácido láctico produzido em todos os processos de fermentação efetuados.

As taxas de rendimento com as diferentes formulações não foram calculadas, já que não foi possível a obtenção real do peso seco da biomassa, por possuírem grande quantidade de sólidos em suspensão dificultando a sua determinação. Estes sólidos são responsáveis pelo aumento da produção de biomassa viável nas formulações, devido à maior superfície de contato que eles proporcionam para os microrganismos. Este é o interesse principal no estudo da otimização dos processos para produção de biomassa e elaboração de inóculos massivos.

Além da produção de biomassa obtida com a utilização do meio 3, os custos de produção com esse substrato viabilizam o processo de produção industrial de inóculos para estes microrganismos consideravelmente, tendo em vista que o custo de 500 g de meio comercial é de R\$ 170 reais e o custo para a elaboração de 1 litro de meio comercial MRS é de R\$19,0 reais, no entanto a matéria prima para a produção de 1 litro de inóculo com a formulação 3 foi cotada em R\$ 0,72 reais.

#### 5.14 ESTUDO DE VIABILIDADE DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS

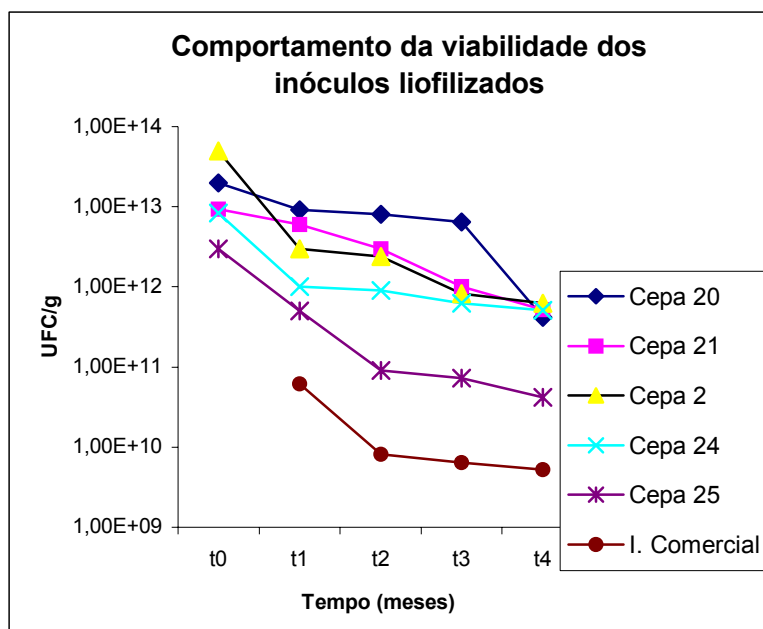
Segundo as condições descritas no item 4.4.1 e no material liofilizado, foi realizado seguimento por quatro meses considerando UFC/g, atividade de água (Aw) e pH, com o propósito de verificar a viabilidade destes à temperatura ambiente e sua evolução durante este tempo com a aplicação das condições referidas. Os resultados obtidos durante o acompanhamento estão plotados no Quadro 29.

**QUADRO 29- COMPARAÇÃO DAS VIABILIDADES DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS ELABORADOS COM AS CEPAS SELECIONADAS**

CEPAS	VIABILIDADE DA BIOMASSA INICIAL SEM LIOFILIZAR UFC/g	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4
<b>20</b>	$2,0 \times 10^{13}$	pH: 5,5 aw: 0,151 UFC/g: $9,2 \times 10^{12}$	pH: 5,2 aw: 0,240 UFC/g: $8,0 \times 10^{12}$	pH: 5,1 aw: 0,232 UFC/g: $6,4 \times 10^{12}$	pH: 5,0 aw: 0,318 UFC/g: $4,2 \times 10^{11}$
<b>21</b>	$9,3 \times 10^{12}$	pH: 5,5 aw: 0,156 UFC/g: $6,0 \times 10^{12}$	pH: 5,4 aw: 0,252 UFC/g: $3,0 \times 10^{12}$	pH: 5,4 aw: 0,290 UFC/g: $1,0 \times 10^{12}$	pH: 5,3 aw: 0,331 UFC/g: $5,2 \times 10^{11}$
<b>2</b>	$5,0 \times 10^{13}$	pH: 5,5 aw: 0,252 UFC/g: $3,0 \times 10^{12}$	pH: 5,3 aw: 0,3 UFC/g: $2,4 \times 10^{12}$	pH: 5,1 aw: 0,342 UFC/g: $8,2 \times 10^{11}$	pH: 5,1 aw: 0,354 UFC/g: $6,3 \times 10^{11}$
<b>24</b>	$8,3 \times 10^{12}$	pH: 5,4 aw: 0,154 UFC/g: $1,0 \times 10^{12}$	pH: 5,4 aw: 0,251 UFC/g: $9,1 \times 10^{11}$	pH: 5,3 aw: 0,253 UFC/g: $6,2 \times 10^{11}$	pH: 5,2 aw: 0,286 UFC/g: $5,1 \times 10^{11}$
<b>25</b>	$3,0 \times 10^{12}$	pH: 5,0 aw: 0,34 UFC/g: $5,0 \times 10^{11}$	pH: 5,4 aw: 0,351 UFC/g: $9,0 \times 10^{10}$	pH: 5,3 aw: 0,372 UFC/g: $7,2 \times 10^{10}$	pH: 5,2 aw: 0,364 UFC/g: $5,2 \times 10^{10}$
<b>Inóculo Comercial</b>	-----	pH: 6,0 aw: 0,265 UFC/g: $6,2 \times 10^{10}$	pH: 6,0 aw: 0,370 UFC/g: $8,2 \times 10^9$	pH: 5,8 aw: 0,433 UFC/g: $6,4 \times 10^9$	pH: 5,5 aw: 0,456 UFC/g: $5,2 \times 10^9$

A resposta de viabilidade obtida pelos inóculos liofilizados foi altamente satisfatória, principalmente por permanecerem com contagens entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$  UFC/g ao final dos quatro meses. O Gráfico 6 mostra a comparação do comportamento de viabilidade dos inóculos liofilizados, incluindo o do inóculo comercial.

**GRÁFICO 6- COMPORTAMENTO DA VIABILIDADE DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS**



Estes valores de viabilidade alcançados pelos inóculos são devidos à adição de sólidos suspensos no meio de crescimento, como farelo de trigo e leite de soja em pó que permitiu maior superfície de contato ou adesão dos microrganismos. A maior parte de estudos efetuados para obtenção de biomassa e preservação de produtos liofilizados para microrganismos entre eles lácticos, alcançam valores de viabilidades entre  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC/g (DE VALDEZ e DIEKMANN, 1993; BROADBENT e LIN, 1999; MEZA *et al.*, 2004).

A Figura 27 indica o comportamento de viabilidade das cepas relacionado com a evolução do pH durante os quatro meses. Autores como FONSECA *et al.* (2001) afirmam que a adição de álcali para a neutralização dos meios de cultura durante o processo de crescimento favorece a sobrevivência dos microrganismos após o congelamento. Durante o crescimento celular não foi controlado o pH em nenhum dos experimentos, já que os microrganismos são resistentes a pH baixos. Alcalinização foi efetuada na biomassa após centrifugação, para neutralizá-la de modo que durante o tempo de estocagem a viabilidade não fosse diminuída pelo efeito do pH, para logo ser submetida à refrigeração por 24 horas e



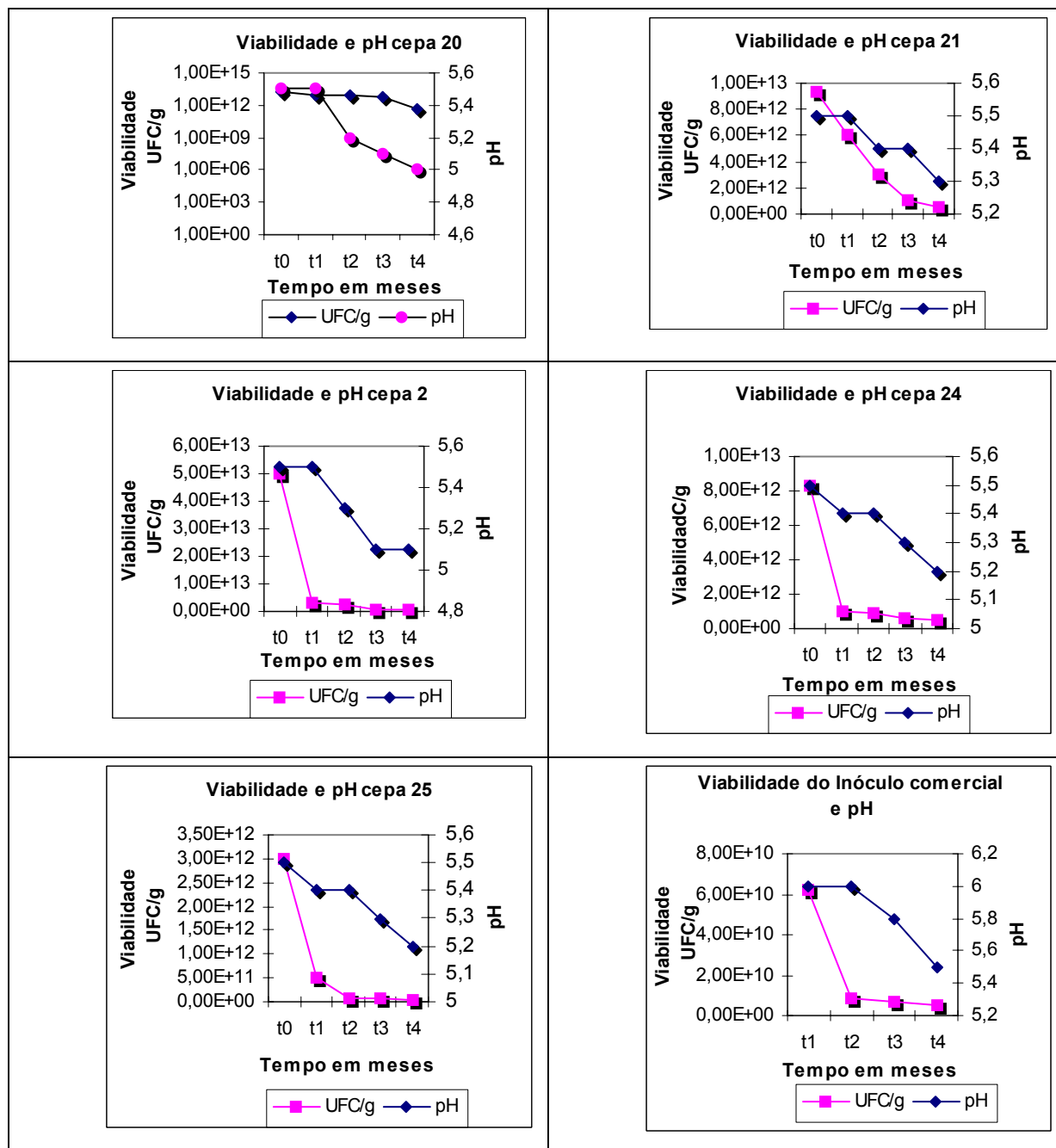
congelamento prévio à liofilização. Os resultados mostraram que a diminuição do pH foi pouca durante os quatro meses, mantendo uma média de pH  $5,2 \pm$  e viabilidade entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$  UFC/g, sendo resultados altamente satisfatórios de acordo ao mencionado anteriormente por (DE VALDEZ e DIEKMANN, 1993; BROADBENT e LIN, 1999; MEZA *et al.*, 2004).

A perda de viabilidade dos inóculos liofilizados no tempo, não alcançou valores acima de três casas decimais (3 log), variando de  $10^{12}$ - $10^{11}$  UFC/g na maior parte dos inóculos elaborados, incluindo o inóculo comercial, que apresentou uma viabilidade de  $10^9$  UFC/g. O decréscimo da viabilidade entre a biomassa antes e após o tratamento de liofilização, foi de uma casa decimal (1log.) para a maioria dos inóculos, isto devido provavelmente à fatores como suspensão do processo de fermentação na fase exponencial e a pré-adaptação a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas antes do congelamento, coincidindo com o citado por BRASHEARS e GILLILAND, (1995) e MORICE *et al.*, (1992).

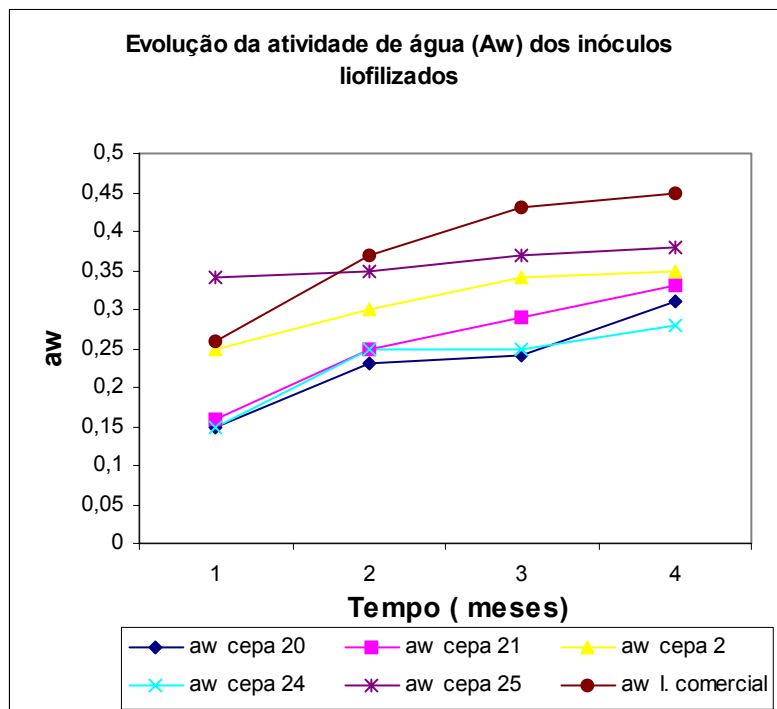
Outro fator relacionado foi a adição de farelo de trigo, que permitiu um maior crescimento microbiano ou adesão superficial dos microrganismos durante a elaboração dos inóculos, e facilitou a secagem durante o processo de liofilização, coincidindo com o expressado por VALDEZ e DIEKMAN, (1993), alcançando valores de atividade de água (aw) entre 0,15 a 0,3 no processo de liofilização (Quadro 22). Tais valores são ótimos considerando que os valores mínimos de Aw que alguns microrganismos requerem para iniciar seu crescimento, estão entre 0,86 a 0,95 de Aw, de acordo com GIBBS e VASSILIS (2001).

Por outro lado, a adição do crioprotetor como glutamato de sódio recomendada por VALDEZ e DIEKMAN (1993), em mistura com farelo de trigo, leite de soja e soro de leite, foi altamente satisfatória para estocagem à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ . No Gráfico 7 e Figura 27, pode-se observar o comportamento e a evolução da atividade de água dos inóculos elaborados.

**FIGURA 27- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E pH DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS DURANTE QUATRO MESES DE SEGUIMENTO**

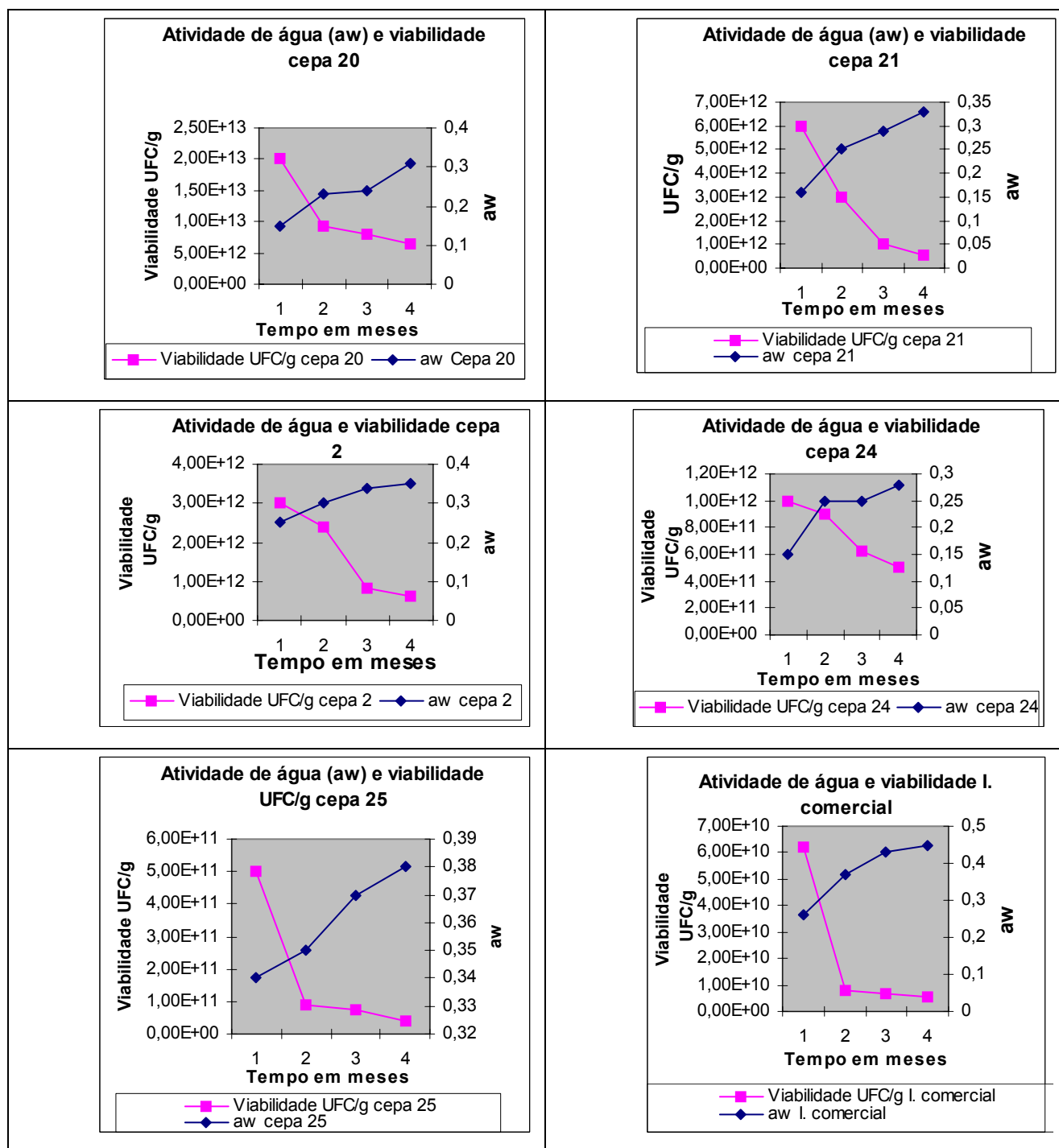


**GRÁFICO 7- COMPORTAMENTO E EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (Aw) DOS INÓCULOS LIOFILIZADOS DURANTE QUATRO MESES DE SEGUIMENTO**



Os resultados obtidos com relação a aw e viabilidade estão indicados na Figura 28.

**FIGURA 28- COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) E VIABILIDADE DURANTE QUATRO MESES DE SEGUIMENTO.**



A atividade de água ( $A_w$ ) é um fator crítico para determinar o tempo de prateleira de um produto, além da temperatura e do pH. Outros fatores podem influenciar na elevação microbiana dos produtos favorecendo a aparição de microrganismos patogênicos ou a elevação da carga microbiana nos inóculos utilizados como iniciadores, ocasionando alterações no substrato e posterior perda de viabilidade. A maior parte das bactérias não se desenvolve em substratos com atividade de água abaixo de 0,91 (LOWE e KERSHAW, 1995).

Durante o acompanhamento das amostras foi detectada elevação da  $A_w$ , de 0,1 a 0,3, sendo estes valores inviáveis para a ativação microbiana, incluído leveduras e fungos. Os valores de pH das amostras apresentaram queda mínima, provavelmente relacionada à elevação da atividade de água e a presença de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação.

Relacionando estes valores e a atividade de água durante os meses de controle, pode-se verificar que não houve deterioração microbiana dos substratos dos inóculos, considerando as condições físico-químicas das amostras, principalmente a  $A_w$  e o pH. De acordo com as condições apresentadas pelos inóculos durante o tempo de controle, podemos afirmar que os inóculos elaborados com a formulação selecionada e com aplicação das condições de liofilização, estes podem ser estocados à 20°C, mantendo uma vida de prateleira em ótimas condições, facilitando a estocagem e diminuindo custos de refrigeração e congelamento.

Estes produtos liofilizados podem ser ativados em substratos afines às bactérias para aplicação no produto desejado. Os testes de ativação efetuados no estudo verificaram que a quantidade requerida de inóculo liofilizado para 10 ml de substrato líquido é de 0,1 g para obter um crescimento de UFC/g de  $10^{10-9}$  em 24 horas. A partir desta medida, pode-se obter por escalonamento a quantidade desejada.

Além dos bons resultados obtidos no processo de liofilização e no seguimento dos produtos liofilizados, pode-se dizer que os inóculos preparados no meio selecionado, com os compostos utilizados como criopreservantes para

liofilização, são apropriados para uso em alimentos, já que outros criopreservantes normalmente utilizados (adonitol,  $\beta$ -glicero-fosfato, polietilenglicol, etc.), apesar de sua eficiência (HUBALEK, 2003), não podem ser utilizados em meios de suspensão para inóculos de microrganismos que vão a ser adicionados em alimentos humanos e animais. Os órgãos de regulação de saúde e alimentos de muitos países podem ser muito estritos, proibindo a adição de algumas substâncias em inóculos que não estejam naturalmente presentes no alimento cru, sendo este outro item favorável ao produto (FDA, 2003).

## 5.15 ENSAIOS *in vivo* COM APLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SELECIONADO

### 5.15.1 Crescimento larval

No Gráfico 8 mostra o crescimento das larvas durante as cinco semanas de tratamento de alimentação com as cepas probióticas 2, 20, 21, 24 e 25, comparadas ao antibiótico oxitetraciclina e amostra controle.

Os resultados mostraram que os ensaios com as cepas probióticas testadas apresentaram uma leve vantagem frente aos tratamentos controle, porém, sem diferenças significativas entre eles ( $p > 0,05$ ). O Quadro 30 indica os resultados obtidos durante as cinco semanas para crescimento larval, onde o p valor ( $Pr > F$ ) apresentou uma tendência de diminuição à zero. Este estudo aponta a sugerir que num período mais prolongado de tratamento com probióticos possivelmente, poder-se-iam obter resultados com diferenças significativas; de acordo com a tendência amostrada.

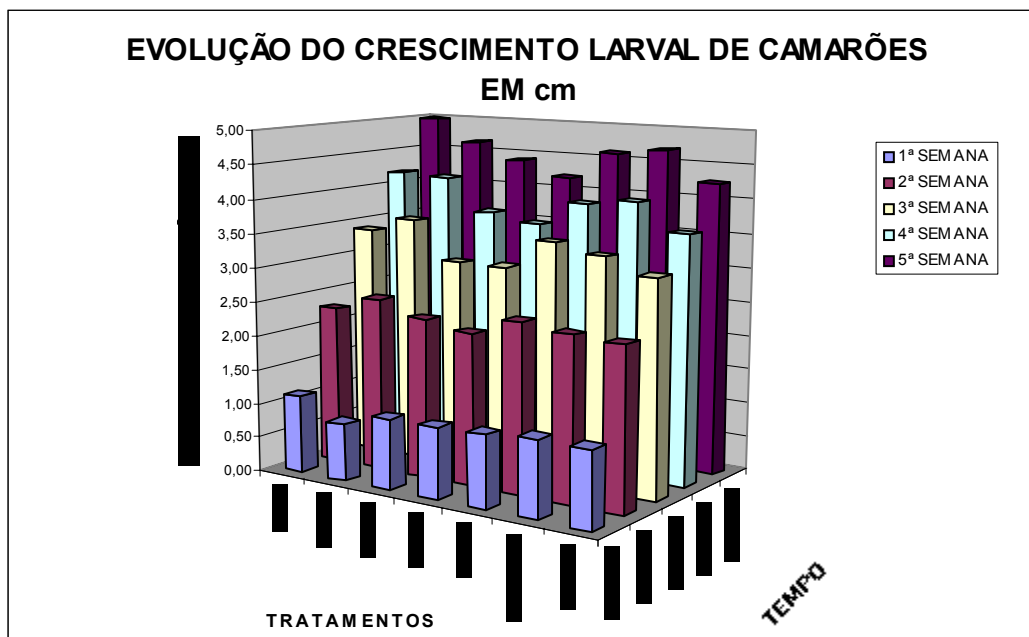
**QUADRO 30- VALORES OBTIDOS PARA CRESCIMENTO EM CINCO SEMANAS DE TRATAMENTO COM PROBIÓTICO**

<b>Semanas de tratamento</b>	<b>Coefficiente de variação (CV)</b>	<b>P. valor Pr &gt; F</b>
1	18,1	1,0
2	13,7	0,9
3	9,6	0,8
4	8,6	0,5
5	7,7	0,1

Os resultados obtidos para crescimento, com tratamento de probiótico, foram similares aos constatados por (HIMABINDU *et al.*, 2004) em seu estudo com pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* que apresentaram um significativo ganho de peso ( $p < 0,05$ ) quando alimentadas com probiótico.

Em estudos efetuados por HEIZHAO *et al.*, (2004) e Bomba *et al.*, (2002), sobre digestibilidade de nutrientes para *Litopenaeus vannamei* com adição de probióticos, foi encontrado que os resultados da aparente digestibilidade tiveram uma diferença significativa quando comparados aos tratamentos sem adição de probióticos. Confirmou-se assim, que os probióticos influenciam nos processos de digestão elevando o crescimento de microrganismos benéficos, aumentando a atividade enzimática, favorecendo a digestibilidade dos alimentos com melhor aproveitamento.

**GRÁFICO 8- EVOLUÇÃO DO CRESCIMENTO LARVAL DE ACORDO COM OS TRATAMENTOS APLICADOS**



Um dos procedimentos para evitar que bactérias indesejáveis formem parte do sistema de aquicultura é utilizando a adição de antibióticos na água (Mac MILLAN, 2002, 2003). No entanto, o maior risco para o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, é o uso destes como promotores de crescimento (HAMEED e BALASUBRAMANIAN, 2000).

A adição de bactérias benéficas pode incrementar a taxa de crescimento larval (GATESOUBE, 1994). Em estudos efetuados por LARA e NOVOA, (2002) foram comparados o efeito dos probióticos e antibióticos como promotores de crescimento em *Tilapia nilótica*. Obteve-se um crescimento superior com o uso de probióticos que quando se comparou com os antibióticos como promotores de crescimento. A adição de probióticos nos tratamentos deste estudo estaria influenciando o melhor aproveitamento dos nutrientes administrados, para pós-larvas de camarão, portanto, a tendência seria conseguir um melhor crescimento das pós-larvas submetidas aos testes de acordo com os resultados obtidos na análise estatística .



### 5.15.2 Sobrevivência das pós-larvas

Nos ensaios de sobrevivência, a análise estatística mostrou; uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com antibióticos e probióticos frente ao controle, demonstrando que os tratamentos com bactérias lácticas probióticas podem competir com o uso de antibióticos. O ensaio reforça os resultados obtidos para testes *in vitro*, no qual foi visto claramente que uma só bactéria láctica tinha mais poder de inibição a vários patógenos que um antibiótico.

O Quadro 31 apresenta os dados obtidos a este respeito. O teste DMS (de diferença mínima significativa) indicou que a sobrevivência do grupo A (com probiótico) foi superior ao grupo B (controle). O Gráfico 9 mostra as porcentagens de sobrevivência obtidas para os diferentes tratamentos. Neste caso as cepas 2 e 21 apresentaram os valores mais próximos ao obtido pelo tratamento com antibiótico, com 90 e 92% de sobrevivência respectivamente, sendo que para o antibiótico foi de 96%. Estes resultados concordaram com os obtidos por RENGIPAT *et al.*, (2000) que encontraram diferença significativa na sobrevivência durante 30 dias de cultivo em grupos com tratamento de probióticos quando comparados com o grupo controle para testes efetuados com *Penaeus monodon*.

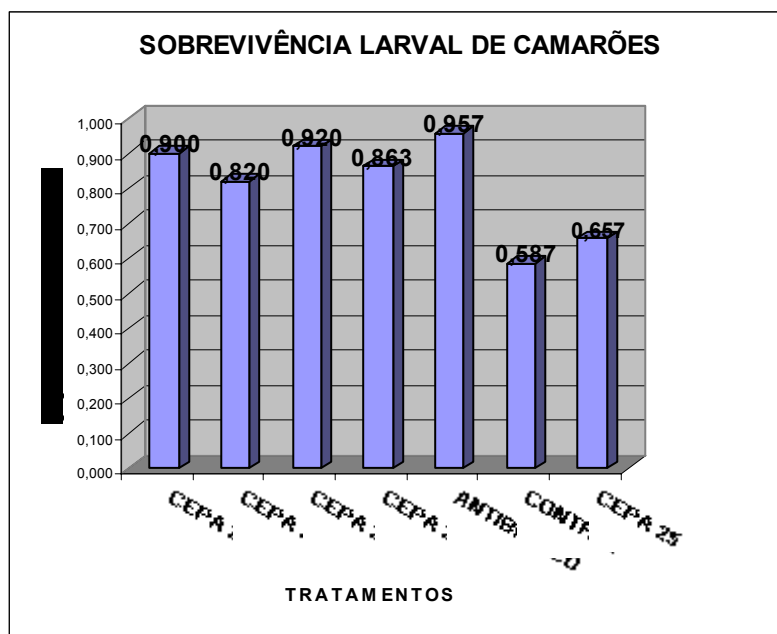
INUTA *et al.*, (2002), mostram o efeito da adição de bactérias lácticas de origem marinho (LM) aplicadas em grande escala para alimentação de camarão (*M. japonicus*), indicando que o alimento com LM foi efetivo no aumento da sobrevivência e ganho de peso, com sobrevivências de 98,5%, sendo que para o grupo sem adição de LM na alimentação a sobrevivência foi de 72%.

### QUADRO 31- ANÁLISE ESTATÍSTICA (DMS) DE SOBREVIVÊNCIA NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Grupos	Val ores	Repeti ções	Tratamentos	Cepas
A	0,9567	3	5	Anti bi óti co
A	0,8633	3	4	20
A	0,8500	3	3	21
A	0,8433	3	1	2
A	0,8167	3	7	25
A	0,7700	3	2	24
B	0,4900	3	6	Controle

GARRIQUES e ARÉVALO (1995) reportaram o uso de *V. alginolyticus* como probiótico e agente responsável pelo incremento da sobrevivência e crescimento em pós-larvas de *Penaeus vannamei*, por exclusão competitiva de bactérias potencialmente patogênicas, mostrando eficientemente a diminuição de tratamentos profiláticos com antibióticos em sistemas de cultivo intensivo.

### GRÁFICO 9- PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA LARVAL COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS



HIMABINDU *et al.*, (2004) administraram dieta de pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* bactérias lácticas probióticas, com efeitos inibidores

aos microrganismos patogênicos Gram-negativos, além de apresentarem crescimento e sobrevivência significativamente maiores ( $p < 0.05$ ) que o grupo controle. Todos estes resultados obtidos nos diferentes estudos indicam que o uso de bactérias probióticas na aquicultura tem influência no crescimento e sobrevivência larval de camarão, aportando um grande benefício ao desenvolvimento da tecnologia de cultivo evitándose o uso de terapias com uso de antibióticos.

#### 5.15.2.1 Aderência e colonização intestinal das bactérias lácticas

Após efetuados cortes do trato digestivo das larvas, os resultados obtidos constatarem a presença de bactérias lácticas em todas as amostras de larvas submetidas ao tratamento com bactérias lácticas a partir do quinto dia de tratamento, de uma forma massiva a colonização das bactérias lácticas nos tecidos intestinais. As figuras 28 e 29 mostram as bactérias presentes na mucosa, epitélio e cegos intestinais do camarão.

As seções de intestinos e hepatopâncreas semeadas em MRS para verificar a presença e viabilidade das bactérias lácticas presentes nestes, demonstraram viabilidade e colonização destes microrganismos no sistema digestivo, constatando ser as mesmas cepas administradas nos tratamentos.

A presença das bactérias lácticas no intestino demonstra a capacidade de ingressar em hepatopâncreas e de não serem afetadas pela atividade enzimática deste. Demonstrou-se a importância do uso de concentrações elevadas de cepas probióticas de modo que possam competir com os microrganismos autóctones ou patogênicos.

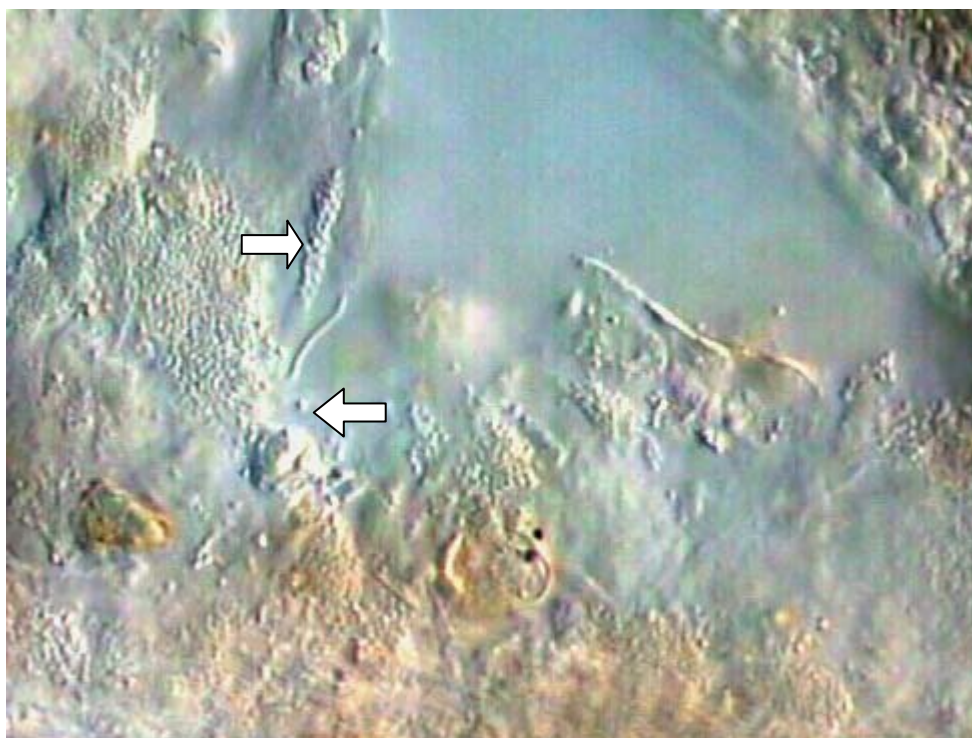
Um microrganismo probiótico deve ter capacidade de adesão às células colonizadas para conseguir efeito antagônico (FULLER, 1989). As bactérias administradas como probióticos demonstraram ter a capacidade de sobrevivência dentro do hospedeiro, resistência aos mecanismos antibacteriais enzimáticos e mecânicos que poderiam dificultar a instalação no intestino. Constata-se a colonização das bactérias lácticas sobre as células epiteliais do intestino do camarão (Figuras 28 e 29) fazendo-se parte da microflora. Conhecendo-se o

tempo de colonização destes microrganismos, é possível estabelecer a frequência de administração de alimento com inóculo nos sistemas de cultivo.

As bactérias que apresentam capacidade de adesão celular podem ser administradas com intervalos mais prolongados do que aquelas que não se aderem, e que deveriam por tanto, ser subministradas de maneira contínua.

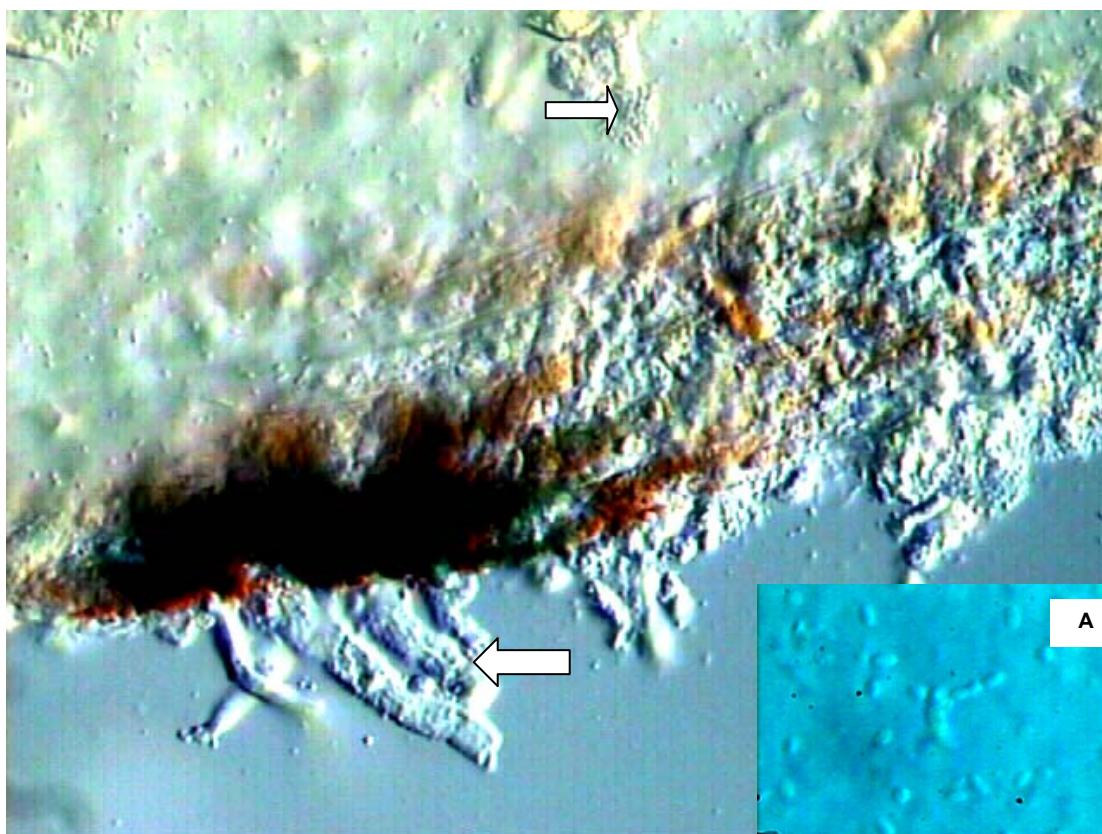
**FIGURA 29- PRESENÇA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM EPITÉLIO INTESTINAL DOS CAMARÕES TRATADOS COM PROBIÓTICO (20X10).**

(Colonização massiva de coco-bacilos, correspondente a estrutura dos microrganismos do estudo)



**FIGURA 30- PRESENÇA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM REGIÕES DE  
INTESTINO CEGO DOS CAMARÕES TRATADOS COM  
PROBIÓTICOS (20X10).**

(Colonização massiva de coco-bacilos, correspondente a estrutura dos microrganismos do estudo com a cepa 2).



**A:** a estrutura correspondente ao *Pediococcus parvulus* cepa 2 administrada no tratamento (100X)

GOMEZ *et al.*, (2000) afirmam que o fato de um microrganismo ter um potencial colonizador é de suma importância para ser considerado como probiótico, assim como a capacidade de sobreviver dentro do órgão colonizado, não afetando o crescimento nem a sobrevivência do hospedeiro. Com isto, os microrganismos selecionados e testados como probióticos neste estudo, podem ser considerados potenciais probióticos para serem aplicados em escala comercial em sistemas de aquicultura para estimulação de crescimento e sobrevivência.

### 5.15.3 Desafio com *Vibrio harveyi*

#### 5.15.3.1 Estudo de interação competitiva

Os resultados indicam que existe uma ação inibitória principalmente pelas bactérias lácticas isoladas no estudo (Quadro 31). Nenhuma das concentrações 1,0:1,0 e 1,0:0,5 para o tratamento de lácticas frente a *Vibrio harveyi*, apresentaram crescimento do patógeno, com exceção das cepas comerciais 24 e 25 só nas concentrações 1,0:0,25 de Vibrio:B.lácticas verificam-se crescimentos, indicando que neste nível as bactérias lácticas exercem menor efeito de inibição.

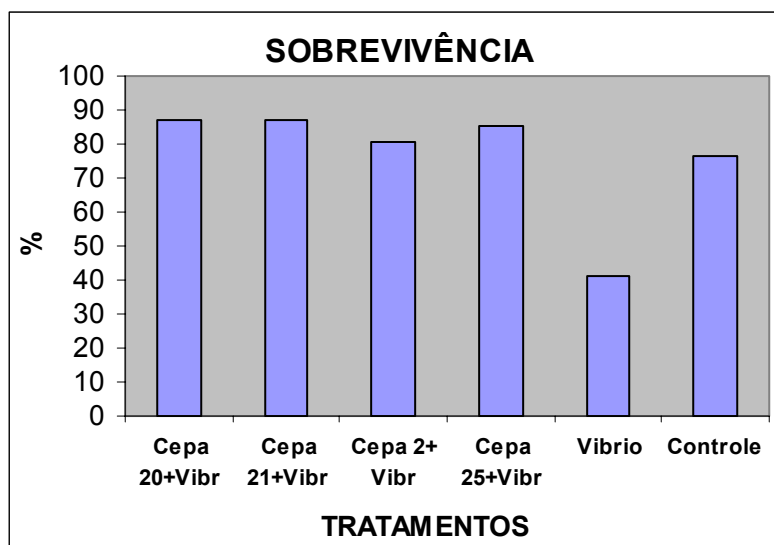
As atividades de antagonismo encontradas neste estudo são suportadas por JACOBSEN *et al.*, (1999) e MOUSTAFA e EL-NAGGAR, (2004). A atividade de antagonismo é devida, possivelmente às substâncias produzidas pelas cepas probióticas capazes de inibir espécies de microrganismos Gram-negativos, (caso do *Vibrio harveyi*). Estes resultados de interação competitiva sugerem que deve existir uma concentração elevada, acima de  $10^5$  UFC/mL de bactérias lácticas para competir e assegurar a total inibição de concentração de vibrios elevada num meio.

**QUADRO 32- RESULTADOS DE INTERAÇÃO COMPETITIVA ENTRE AS  
CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DO ESTUDO E *Vibrio harveyi* A  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

Tratamentos	1,0 mL	0,5 mL	0,25 mL	Tratamentos	0,5 mL	0,25 mL
<b>Cepa 20+ <i>V. harveyi</i></b>	1,0 mL de cepa 20 + 1,0 mL de <i>V. harveyi</i> . 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 20+ 0,5 mL de <i>V. harveyi</i> . 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 20 + 0,25 mL de <i>V. harveyi</i> . 0 UFC/mL	<b><i>V. harveyi</i> + Cepa 20</b>	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,5 mL de cepa 20 0 UFC/mL	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,25 de cepa 20 $2,6 \times 10^3$ UFC/mL
<b>Cepa 21+ <i>V. harveyi</i></b>	1,0 mL de cepa 21 + 1,0 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 21 + 0,5 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 21 + 0,25 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	<b><i>V. harveyi</i> + Cepa 21</b>	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,5 de cepa 21 0 UFC/mL	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,25 de cepa 21 $3,1 \times 10^2$ UFC/mL
<b>Cepa 2 + <i>V. harveyi</i></b>	1,0 mL de cepa 2 + 1,0 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 2 + 0,5 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 2 + 0,25 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	<b><i>V. harveyi</i> + Cepa 2</b>	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,5 mL de cepa 20 0 UFC/mL	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,25 mL de cepa 2 0 UFC/mL
<b>Cepa 24 + <i>V. harveyi</i></b>	1,0 mL de cepa 24 + 1,0 mL de <i>V. harveyi</i> $4,2 \times 10^2$ UFC/mL	1,0 mL de cepa 24 + 0,5 mL de <i>V. harveyi</i> $2,4 \times 10^3$ UFC/mL	1,0 mL de cepa 24 + 0,25 mL de <i>V. harveyi</i> $8,4 \times 10^3$ UFC/mL	<b><i>V. harveyi</i> + Cepa 24</b>	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,5 mL de cepa 24 $8,4 \times 10^3$ UFC/mL	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,25 de cepa 24 $2,1 \times 10^4$ UFC/mL
<b>Cepa 25 + <i>V. harveyi</i></b>	1,0 mL de cepa 24 + 1,0 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 25 + 1,0 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	1,0 mL de cepa 25 + 0,25 mL de <i>V. harveyi</i> 0 UFC/mL	<b><i>V. harveyi</i> + Cepa 25</b>	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,5 mL de cepa 25 $5,2 \times 10^3$ UFC/mL	1,0 mL de <i>V. harveyi</i> + 0,25 de cepa 25 $7,2 \times 10^4$ UFC/mL

### 5.15.3.2 Desafio com *V. harveyi*

Os resultados mostraram que existe uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tratamento de larvas PL20 sem administração de probióticos e desafio com *Vibrio harveyi*. contra o tratamento com subministro. O Gráfico 10 indica as percentagens de sobrevivência obtidas nos diferentes tratamentos e o Quadro 33 mostra os resultados obtidos com o teste Tukey para separação de médias.

**GRÁFICO 10- SOBREVIVÊNCIA NO DESAFIO COM *Vibrio harveyi*****QUADRO 33- SOBREVIVÊNCIA DAS PÓS-LARVAS APÓS****O INÓCULO COM *Vibrio harveyi***

Tratamento	Sobrevivência
Cepa 20	93,57 a*
Cepa 21	93,33 a
Cepa 25	91,43 a
Cepa 2	86,19 a
Controle	81,79 a
<i>Vibrio harveyi</i>	43,93 b
Cv = 19%	

\* Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

As análises estatísticas mostraram que o tratamento desafiado com *Vibrio harveyi*, sem adição prévia de bactérias lácticas, apresentou diferenças marcadas frente aos demais tratamentos, incluindo o controle, referente ao parâmetro sobrevivência. Todos os tratamentos efetuados com adição de cepas probióticas de bactérias lácticas, mostraram percentagens de sobrevivência acima de 80%, quando comparados com o tratamento sem adição de probióticos cujos resultados foram de apenas 41%.

As pós-larvas desafiadas com *Vibrio harveyi* e sem administração de probiótico, apresentaram sintomas de estresse tais como coloração avermelhada



nos pleópodos e inflamação do hepatopâncreas. Não foi possível encontrar outros sintomas mais confirmativos da doença devido ao tempo curto de exposição ao vibrio (48 horas). Estes resultados são similares aos encontrados por RENGIPAT *et al.*, (2000) num estudo efetuado com *Penaeus monodon*, tratando as larvas com bacilos probióticos antes do desafio com *V. harveyi*, onde encontraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), com sobrevivências de 54,3% quando comparadas com o grupo não tratado, com 35,5%. Neste estudo foram obtidos resultados ainda mais pronunciados com as cepas probióticas utilizadas para verificar o efeito inibidor a este patógeno.

RENGIPAT *et al.*, (1998) reportaram também o uso de *Bacillus* S11 como probiótico administrado em diferentes concentrações, com rápido desenvolvimento em curto tempo e diminuição das doenças e mortalidade nas larvas de *Penaeus monodon*. As larvas continuaram sendo alimentadas por cem dias com *Bacillus* S11, adicionado no alimento, quando foram desafiadas com *Vibrio harveyi* por imersão. Dez dias depois, todos os grupos tratados com *Bacillus* S11 apresentaram 100% de sobrevivência enquanto o grupo controle apenas 26% de sobrevivência. O experimento realizado neste estudo, teve uma duração de três dias e os probióticos foram adicionados na água para efetuar posterior desafio com *V. harveyi*. A concentração de probióticos é mais efetiva quando os probióticos são administrados diretamente na alimentação já que na água são diluídos. No entanto, os probióticos foram efetivos com resultados altamente satisfatórios, demonstrando que tratamentos curtos com subministro de probiótico na água mantém a sobrevivência larval, pelos probióticos se instalar no trato digestivo rapidamente, inibindo a ação dos microrganismos patogênicos.

LAVILLA-PITOGO *et al.*, (1990) observaram que a colonização de bactérias ocorre especificamente nas fases iniciais do aparelho digestivo e cavidade oral SIMÕES *et al.*, (2002) estudaram as vias de colonização por bactérias em larvas de camarões penéidos e afirmaram que a colonização inicial do intestino tem um impacto direto sobre a sobrevivência e crescimento, sendo o detectado no experimento realizado neste estudo, ocasionando a exclusão competitiva do *Vibrio harveyi* pela colonização inicial das bactérias probióticas.

A administração preventiva de bactérias probióticas pode prevenir as infecções causadas por *Vibrio harveyi* nos estágios iniciais de desenvolvimento larval. As bactérias probióticas testadas mostraram efetividade como protetoras inibindo o desenvolvimento do *Vibrio harveyi* confirmando o demonstrado pela ação inibitória *in vitro* e o teste de interação competitiva.

5.15.4 Ensaios de desafio com *Vibrio alginolyticus* em camarões juvenis provenientes de lotes com diagnóstico positivo por PCR para WSSV. para verificar o efeito imuno-estimulante das bactérias lácticas.

#### 5.15.4.1 Sobrevivência

Os resultados de sobrevivência obtidos no estudo estão plotados no Quadro 34, indicando diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com probiótico ( $p < 0,05$ ). Estes resultados coincidem com os já encontrados por autores como CARRIQUES e AREVALO (1995) reportando uma elevação na sobrevivência por exclusão competitiva dos probióticos.

VILLAMIL *et al.* (2003) comprovaram que as bactérias ácido lácticas inibiram o crescimento de *Vibrio alginolyticus* e RENGIPAT *et al.*, (2000) reportaram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com 54,3% de sobrevivência em camarões tratados com *Bacillus* S11 frente aos não tratados (35%) após de serem submetidos a desafio com *Vibrio harveyi*. Em estudos efetuados pelo CENAIM, (2004), com imunoestimulação de camarões *Litopennaeus vanamei*, desafiados com WSSV e tratados com bactérias probióticas, foi obtida uma sobrevivência de 72,5% frente a 57,83% sem o probiótico.

Estes resultados indicam que as bactérias lácticas probióticas exercem um efeito benéfico sobre o sistema imune e a sobrevivência dos camarões. Neste estudo, a mortalidade dos camarões não tratados com probióticos se deu após três horas da inoculação do *Vibrio alginolyticus*, apresentado sintomas como expansão de cromatóforos em brânquias, urópodos, pleópodos, télson e antênulas com uma coloração avermelhada, e algumas necroses localizadas, e

apresentando, em alguns animais, a sintomatologia característica do WSSV com pontos brancos de 1 mm de diâmetro no interior da carcaça. Enquanto, os camarões tratados com probióticos não apresentaram nenhuma sintomatologia.

A dose de vibrio aplicada de 100 µl foi suficiente para causar a morte dos camarões juvenis de 4 a 5 gramas em 3 horas. Outros autores como BURGENTS *et al.*, (2004), em estudos de desafio em camarões juvenis, com injeção de doses de vibrio nas mesmas concentrações, o tempo de mortalidade foi entre 8 e 12 horas. Neste estudo a mortalidade foi mais rápida, provavelmente devido a carga viral do WSSV já presente e previamente detectada que somada à carga microbiana de *Vibrio alginolyticus*, debilitou ainda mais o sistema imune dos animais, confirmado com os resultados obtidos para avaliação da resposta imune como sobrevivência, tempo de coagulação, contagem total de hemócitos e atividade antibacteriana da hemolinfa (Quadro 34 e 35).

Em estudos realizados por SELVIN e LIPTON (2003) sobre patogenicidade em camarões infestados com WSSV e inoculados com *Vibrio alginolyticus*, não sobreviveram à infecção secundária; indicando com isto que as bactérias lácticas administradas no alimento permitiram uma elevada sobrevivência quando se comparou com o tratamento controle, indicando um claro efeito do tratamento com os probióticos do estudo.

**QUADRO 34- MORTALIDADE DOS CAMARÕES APÓS INÓCULO  
COM *Vibrio alginolyticus***

TRATAMENTO	MORTALIDADE (%)
Controle dieta sem probiótico	54± 9a
Dieta com probiótico	11± 7b

\* Letras diferentes significam diferenças significativas t (p<0,05).

#### 5.15.4.2 Resultados da resposta imune

Contagem total de hemócitos na hemolinfa (THC): Os resultados obtidos com camarões tratados e não tratados com probiótico, antes e depois do desafio,

estão apresentados no Quadro 34. O número de hemócitos foi significativamente diferente antes do desafio com vibrio, sendo maior para os camarões tratados com lácticas. A após do desafio, não se apresentarem diferenças significativas entre os tratamentos, a concentração de hemócitos foi maior nos camarões alimentados com a cepa probiótica.

A concentração total dos hemócitos apresentou tendência de aumento após desafio durante as primeiras horas, permanecendo todos dentro de níveis aceitáveis. As amostras para análise foram tomadas durante as primeiras três horas após efetuado o desafio.

Num estudo realizado pelo CENAIM, (2004), nas análises imunitárias efetuadas, foi encontrado que os animais cultivados com probióticos apresentaram melhor índice imunitário, respondendo ao WSSV com proliferação de hemócitos. Tais resultados indicam que os tratamentos com probióticos poderiam favorecer o incremento de hemócitos como mecanismo de resposta à infecções.

#### QUADRO 35- HEMÓCITOS NA HEMOLINFA ANTES E DEPOIS DA INOCULAÇÃO DE *Vibrio alginolyticus*

TRATAMENTO	ANTES DA INOCULAÇÃO	DEPOIS DA INOCULAÇÃO
Grupo controle sem tratamento com probiótico	8,61E+05 ± 1,87E+05a	1,02E+06 ± 0,13E+06a
Com tratamento prévio de probiótico	1,02E+06 ± 0,016E+06 b	1,12E+06 ± 0,2E+06a

Letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05)

Coagulação da hemolinfa: O tempo de coagulação da hemolinfa apresentou diferenças significativas (p<0,05) tanto nos controles como nos tratamentos com probiótico, antes e depois do desafio. Os resultados foram marcantes nos animais após o desafio, indicando um claro impacto no sistema imune, principalmente para os tratamentos sem adição de bactérias lácticas, sinalando que a doença foi generalizada debilitando o sistema imune. O Quadro 36 mostra os resultados obtidos.

**QUADRO 36- TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA ANTES E DEPOIS  
DA INOCULAÇÃO DE *Vibrio alginolyticus***

TRATAMENTO	ANTES DA INOCULAÇÃO (SEGUNDOS) (MÉDIA ± EP)	DEPOIS DA INOCULAÇÃO (SEGUNDOS) (MÉDIA ± EP)
<b>Controle</b>	92 ± 7a	274 ± 21a
<b>Probiótico</b>	65 ± 8a	88 ± 24b

Letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05)

Um importante processo nos crustáceos é a rápida coagulação das lesões, prevenindo assim as perdas substanciais de hemolinfa e evitando o ingresso de microrganismos. O fator de coagulação dos crustáceos é um dímero reticulado pela ação de uma proteína liberada pelos hemócitos (WANG *et al.*, 2001). Com os resultados obtidos de baixa coagulação nos animais não tratados com probióticos, se deduz que a alteração do sistema imune ocasionada por infecções virais e bacterianas conjuntas, interferem na liberação da proteína responsável pela coagulação, com a conseqüente perda de coagulação. Tal resultado foi claro nos animais não tratados com probiótico antes do desafio, indicando que a adição de probióticos na alimentação exerceu um efeito altamente positivo na hemolinfa, favorecendo a liberação da transglutaminasa liberada pelos hemócitos para o processo de coagulação.

Atividade antibacteriana: A atividade antibacteriana foi determinada pela presença de colônias de *Vibrio alginolyticus* nas placas de petri semeadas com 0,1 mL de hemolinfa. Os resultados mostraram marcante diferença entre o grupo tratado com probiótico e o não tratado. Ocorreu crescimento bacteriano com presença de *Vibrio alginolyticus* em concentrações de  $10 \times 10^3$  UFC/mL para o grupo controle em todas as placas semeadas. Porém, os resultados obtidos para o grupo tratado com probiótico foram de  $10 \times 10^1$  UFC/mL apenas em algumas amostras, sendo negativo o crescimento na maioria, indicando alta inibição do patógeno neste grupo. Os resultados estão plotados no Quadro 37.

Estes resultados coincidem com o referido por ADAMS, (1991) que demonstra que mais de 99% das bactérias de *V. alginolyticus* foram eliminadas da hemolinfa de *P. monodon* após 4 horas de exposição ao microrganismo.

#### QUADRO 37- CONCENTRAÇÃO DE VIBRIO NA HEMOLINFA (UFC/ml)

TRATAMENTO	CONTAGEM DE <i>V. ALGINOLYTICUS</i> NA HEMOLINFA (UFC/ML $\pm$ EP)
Controle sem tratamento com probiótico	1,88E+03 $\pm$ 0,12E +03 a*
Com tratamento de probiótico	6,44E+01 $\pm$ 0,03 E +03 b

\*Letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05)

Estudos em crustáceos (CHISHOLM & SMITH, 1992; NOGA *et al.*, 1996) têm demonstrado a habilidade da hemolinfa de inibir o crescimento bacteriano. SUNG *et al.*, (1996 a) reportaram que células de *V. vulnificus* foram quase eliminadas da hemolinfa de *P. monodon*, 12 horas após exposição ao microrganismo, desaparecendo completamente às 24 horas. Com estes resultados se pode deduzir que existe na hemolinfa do camarão um mecanismo de resposta inata frente à presença de microrganismos patógenos referenciado por BACHÈRE *et al.*, (2000), caracterizados como peptídeos antimicrobianos “peneidinas”.

Pode-se supor que o tratamento com probióticos favorece a expressão destes peptídeos ou estimula a produção deles para inibição dos microrganismos patogênicos. Comparando-se os resultados obtidos para os animais não tratados com probióticos, não houve resposta de inibição bacteriana na hemolinfa, provavelmente devido a que seu sistema imune já estava previamente debilitado com a presença do WSSV e de *V. alginolyticus*.

De acordo com as estratégias recomendadas para o controle de infecções virais e bacterianas por ITAMI *et al.*, (1998) e MALDONADO *et al.*, (2004), os peptídeos derivados de microrganismos lácticos como *Bifidobacterium termofilum*, são reconhecidos por melhorar a atividade fagocítica dos hemócitos em animais desafiados experimentalmente com WSSV, incrementando a resistência e a sobrevivência dos animais ao vírus. Neste caso a bactéria láctica 2, testada como imuno-estimulante, mostrou uma resposta altamente satisfatória, indicando que

pode ser aplicada via oral através da dieta com o propósito de proteger e dar resistência à doenças virais e bacterianas.

Em estudos efetuados por MAEDA (2002) foi determinada a atividade anti-vírus exercida pela cepa bacteriana probiótica VKM-124 *Pseudoalteromonas undina*, conhecida por sua capacidade de inibição de vibrios, usada na aquicultura, demonstrando a inibição do crescimento de vírus em culturas de tecido.

MAEDA e LIAO (1994) e TANAKA *et al.*, (1996) realizaram experimentos em peixes infestados com baculovírus e iridovírus adicionando  $10^6$  células/ml de *Pseudoalteromonas undina*, encontrando taxas de sobrevivência muito mais elevadas nos ensaios com a adição da bactéria quando comparados com os que não receberam o microorganismo. ARANISHI (1999) reportou que as proteases presentes na epiderme de alguns animais marinhos degradam as paredes celulares de muitos patógenos, o fato sugere que as proteases e outras enzimas produzidas por microrganismos probióticos podem bloquear a ação dos vírus patógenos, degradando a cobertura protéica destes.

Com estes estudos sugerem-se pesquisas direcionadas a verificar a possibilidade dos microrganismos selecionados e testados neste estudo e outros microrganismos de apresentarem atividades antivirais. A partir dos resultados obtidos neste experimento pode-se sugerir o uso destes microrganismos para o controle do *Vibrio* e como imunoestimulante subministrado via oral na dieta para prevenção de doenças bacterianas e virais.

## 6 CONCLUSÕES

As cepas probióticas isoladas e selecionadas neste estudo mostraram ter qualidades probióticas para serem aplicadas em sistemas de aquicultura de camarões *Penneus vannamei*, indicaram boa capacidade de inibição dos microrganismos patogênicos e agindo como imunoestimuladoras do sistema imune de animais portadores de WSSV e desafiados com *Vibrio alginolyticus*. Sendo, portanto, de grande utilidade para o controle das doenças bacterianas e

virais que atingem a carcinicultura, permitindo melhorar o desenvolvimento da indústria aquícola.

Quanto à identificação das bactérias pelos métodos bioquímico e molecular, se pode verificar que o método de sequenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene rRNA 16S agrupou as cepas 20 e 21 com as linhagens tipo de *Lactobacillus plantarum*, *Lb. paraplantarum* e *Lb. pentosus*, não definindo em termos absolutos a identificação destas amostras em nível de espécie. O gene que codifica para o rRNA 16S apresentou-se muito conservado, não se constituindo um marcador adequado para diferenciação destas espécies, no entanto os padrões de ácidos orgânicos as definem como cepas diferentes.

A cepa 2 foi identificada em nível de espécie como *Pediococcus parvulus* com uma probabilidade de 89 a 99%.

O meio 3 selecionado como alternativo para crescimento das bactérias lácticas, resultou ser altamente favorável ao desenvolvimento destas, demonstrado nas cinéticas, além de diminuir os custos para produção industrial.

Os inóculos liofilizados utilizando a formulação do meio 3 e a metodologia aplicada para liofilização, apresentaram resultados muito satisfatórios mantendo boa viabilidade dos inóculos durante os quatro meses de seguimento, indicando que esta metodologia pode ser aplicada nos processos de liofilização para administração de bactérias lácticas probióticas.

## 7 RECOMENDAÇÕES

-Selecionar cepas isoladas de camarões não cultivados próprios das zonas costeiras brasileiras e verificar suas propriedades probióticas para aplicação na aquíicultura brasileira.

-Testar as cepas caracterizadas e selecionadas no estudo para cultura de peixes e moluscos verificando sua ação nestas espécies.

-Efetuar estudos de aderência e permanência no intestino para planejamento de administração de dietas.

-Pesquisar a presença e ação dos peptídeos presentes nestes microrganismos e sua ação imunoestimulante.



- Verificar a resposta destes probióticos aplicados em grande escala.
- Efetuar estudos de desenvolvimento do produto em escala industrial.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGUIRRE, G. G. **Aplicación de probióticos en la acuicultura avances en nutrición acuícola**. Memorias del primer Simposium Internacional de Nutrición acuícola 11-13 de noviembre 1992, Universidad Autónoma Nuevo León, México. <http://fmvz.uat.edu.mx/Investigacion/alfabetico/probioti.pdf>. Consulta Oct. 23/04.
- 2 AGUIRRE-GUZMAN, G.; MEJÍA RUÍZ, H. and ASCENCIO F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, v. 35, p.1395-1404, 2004.
- 3 AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁSQUEZ-JUÁREZ, R. and ASCENCIO, F. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* Species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 215-219, 2001.
- 4 AL-AHMAD, A.; DASCHNER, F.D. and KUMMERER, K. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G. and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, v. 37, p.158-163. 1999.
- 5 ALEXON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology, p. 1-72 In S. Salminen and A. von Wright (ed.) **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1998.
- 6 AMORNCHAI, S. Chloramphenicol in Aquaculture. Aquatic Animal Research Institute Bangkok. 10900. Thailand. v. 2 n°1, 2002. [s.go.th/aahri/Health\\_new/AAHRI/Tpics/NewsLetter/art54.htm](http://s.go.th/aahri/Health_new/AAHRI/Tpics/NewsLetter/art54.htm)
- 7 ANDERSEN, S. R. and SAANDA, R. A. Distribution of tetracycline resistance determinants among Gram-negative bacteria marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 908-912, 1994.

- 8 ANDERSON, R.E.; DAESCHEL, M. A.; and HASSAN, H.M. Antibacterial activity of plantaricin SIK-83 , a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* . **Biochem.**, v. 70, p. 381-390. 1988.
- 9 ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M. and MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94 n. 3 p. 403. 2003.
- 10 AQUALIDER. **Os perigos do uso de antibióticos na Aquicultura.** [www.aqualider.com.br/article.php?recid=88](http://www.aqualider.com.br/article.php?recid=88) Consulta 18/08/2004.
- 11 ARANISHI, F. Possible role for cathepsins B and L. in bacteriolysis by Japanese eel skin. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p.61-64, 1999.
- 12 BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX, D.;BULET, P. *Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectoris of innate immunity.* **Aquaculture**, v.191, p. 71-78, 2000.
- 13 BACHÈRE, E. Anti-infectious imune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquiculture**, v. 227, p. 427-438, 2003.
- 14 BAREFOOT, S. F. & KLAENHAMMER, T.R. Purification and Characterization of the *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin Lactacin B. **App. and Environ. Microbiol.**, v. 26, p. 328-334,1984.
- 15 BENBROOK, K. C. M. **Antibiotic drug use in U.S. Aquaculture**, 2002 <http://WWW.iatp.org/fish>. Consulta 26 de octubre/04.
- 16 BOMBA, A.; NEMCOÁ, R.; GANCARÉIKOVÁ, S.; HERICH, R.; GUBA, P. and MUDRONOVA, D. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrinus fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n.1, p. 95-99.

- 17 BRASHEARS, M. M. and GILLILAND, S. E. Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. **J. Dairy Sci.** v. 78, n. 2326 p. 23-35, 1995.
- 18 BROADBENT,JEFFERY,R; LIN CHAN. Effect of Heat Shock or Cold Shock Treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to Freezing and Lyophilization. **Criobiology** v. 39, p. 88-102,1999.
- 19 BURGENTS, E JOSEPH; BURNETT, G. KAREN and BURNETT, E LOUIS. Disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. **Aquaculture** v. 231,p. 1-8, 2004.
- 20 CAHILL, M. M. Bacterial flora in fishes: a review. **Microbiol. Ecol.** v.19, p. 21-41, 1990.
- 21 CAI, Y. M; BENNO, Y.; NAKASE, T.,OH TK. Specific Probiotic Characterization of *Weissella Hellenica* Ds-12 Isolated From Flounder Intestine. **Journal of General and Applied Microbiology** v. 44, n.5, p. 311-6, 1998.
- 22 CARR, F.J.; CHILL, D. and MAIDA, N. The lactic Acid Bacteria: A Literature. **Critical Reviews in Microbiology** v. 28 n° 4 p. 281-370, 2002.
- 23 CENAIM, CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E INVESTIGACIONES MARINAS. Inmunoestimulación temprana de camarones *Litopenaeus vannamei* para inducir un mejor desarrollo del sistema inmune y resistencia al WSSV. **Panorama Acuicola** v. 9 n. 3 Marzo/Abril del 2004.
- 24 COLLINS, M. D.; FARROW, J. A.E.;PHILLIPS, B.A.; FERUSU, S. and JONES, D.Classification of *Lactobacillus divergens*, and some catalase negative, Asporogenous, rodshaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium* *int. J. Syst. Bacteriol.* v. 37, p. 310-316 1987.
- 25 CONDON,S. Responses of Lactic Acid Bacteria to Oxygen. **FEMS Microbiol.** v. 46 p. 269-280, 1987.

- 26 CRITTENDEN, R.; LAITILA, A.; FORSSELL, P.; MATTO,J.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T. and MYLLARINEN, P. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and implication of probiotics technologies. **Journal of Microbiology and Technology**. 2001
- 27 CUNDLIFFE, E. Self defence in antibiotic producing organisms. **British Medical Bulletin** vol. 40 p. 61-67,1984.
- 28 CURRIE, D. J. Aquaculture: Opportunity to benefit mankind. **World Aquaculture**, v. 31, n.1, p. 44-99, 2000.
- 29 CHAHAL, S. P. **Lactic Acid** In: Encyclopedia of industrial Chemistry. Col. 15 Ed. Verlag Chemie Germany, 1990.
- 30 CHAMBERS, H. F.;SANDE,M.A. Antimicrobial agents: General considerations In: HARDMAN, J.G. & LIMBRID, L.E.: Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9<sup>a</sup> ed., International Edition, New York, NY. 1055 p.,1996.
- 31 CHEN, E.R.; LIU, P.C. and LEE, K.K. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios*, v. 98, p. 95-111, 1999.
- 32 CHIQUITO, M. & MONTIANI F. F. **Resistência Bacteriana a Antibióticos in: Antibioticoterapia em pequenos animais**. Ed. Ícone São Paulo. 214 p. 1997.
- 33 CHISHOLM, J.R.S. and SMITH, V. 1992. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab. *Carcinus maenas*. **J. Marine Biology**. Assoc. U.K., v.72, p. 529-542,1992.
- 34 CHOPRA, I. Antibiotic resistance resulting from decreased drug accumulation. *British Medical Bulletin* v. 40 p. 10-17, 1984.
- 35 DAESCHEL, M. A . Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, v. 43, p. 164-167,1989.

- 36 DAHL, T. A.; MIDDEN, W. E. ;HARTMAN, D. E. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. **J. Bacteriol.** Vol.171, p. 2188-2194,1989.
- 37 DAVEY, G. & RICHARDSON, B. C. Purification and Some Properties of Diplococci from *Streptococcus cremoris* 346. **Dairy Sci. Technol.** V. 16 p. 84-89,1981.
- 38 DE PAIVA ROCHA, I. A indústria brasileira de camarão cultivado. Palestra apresentada no Seminário Internacional Sobre a indústria do Camarão Cultivado, WAS' 2003, 19-23 de Maio, Salvador Brasil. [www.meraquacultura.com.br/arquivos/A%20industria%20brasileira%20camarao%20cultivado](http://www.meraquacultura.com.br/arquivos/A%20industria%20brasileira%20camarao%20cultivado). Consulta 16/09/2004.
- 39 DE ROISSART, H; LUQUET, F. M. **Bacteries lactiques Aspects Fondamentaux et Technologiques.** V. 2 Ed. Loriga, France,1994.
- 40 DE VALDEZ, F. G. and DIEKMANN, H. Freeze-Drying Conditions of Starter Cultures for Sourdoughs. **Criobiology** v. 30, p. 185-190, 1993.
- 41 De MAN, J.C.; ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. A medium for the Cultivation of Lactobacilli. **J.Appl. Bact.** V. 23, p.130-135, 1960.
- 42 DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHERE, E. Peneidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p. 28398-28406, 1997.
- 43 DIXON, B. *La Biología de la resistencia antibiótica* **Panorama Aquícola** , v6 N° 6 p. 24-26. 2001.
- 44 DOPAZO, C. P.; LEMOS, M. L.; LODEIROS, C.; BOLINCHES, J.; BARJA, L.; TORANZO, A. L. "Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens" **J. Appl. Bacteriol** v. 65.p. 97-101, 1988.

- 45 DOYLE, M.E. **Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry**.2001. <http://www.wisc.edu/fri/briefs/antibiot.pdf>. Consulta : 10/13/2004.
  
- 46 FDA. **World Food Regulation Review Incorporating International Food Safety News. Published by Research Information Ltd.** Ed. Managing, v. 3, Nº 7, 2003.
  
- 47 FAHENIA, R. C. **Camarão em cativeiro**. <http://www.mercadopescas.com.br/noticias2.php?id=2036>. Consulta 15/08/2004 .
  
- 48 FAO Nutrition Meetings Report Series No. 40 A, B, C WHO/Food Add./67. 29. **Toxicological Evaluation of some Antimicrobials, Antioxidant, Emulsifiers, Stabilizers, Flour-Treatment Agents, Acids and Bases..** <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj44.htm> Consulta 16/09/2004.
  
- 49 FILOSE, J. Mercado Mundial de Camarón. Estado actual y predicciones. **Panorama Aquícola**. V. 8 n. 5 p. 34-37. 2003.
  
- 50 FONSECA, F.; BEAL, C. And CORRIEU G. Operating Conditions That Affect the Resistance of Lactic Acid Bacteria to freezing and Frozen Storage. **Criobiology** V. 43 p. 189-198, 2001.
  
- 51 FOOD AND ENVIRONMENT. **Antibiotic Resistance** (Animal Agriculture), [http://www.ucsusa.org/food\\_and\\_environment/antibioticresistance/page.cfm?page/D=274](http://www.ucsusa.org/food_and_environment/antibioticresistance/page.cfm?page/D=274) 2003. Consulta Outubro 6/2004.
  
- 52 FOX, S. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Vet. Med.**,v. 22 p. 806-823, 1988.
  
- 53 FULLER, R. History and development of probiotics. In: **Probiotics: the Scientific Basis**, Chapman and Hall, London, 232 p. 1992.

- 54 FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **J. App. Bact.** n. 66, 365-378, 1989.
- 55 GARCIA, F. and J. P. MASSAM. Elimination of antibiotics in hatcheries while improving production levels by use of probiotics. **World Aquiculture** v. 35 n. 1, p. 57-59, 2005.
- 56 GARCIA-ULLOA, M. Aditivos nutricionales: probióticos. **Panorama aquícola**, v 8 n. 5, p. 38, 2003.
- 57 GARRIQUES, D. & ARÉVALO, G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: BROWDY C.L. and HOPKINS, S.J. (eds.) Swimming through troubled water. Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming. Aquaculture'95. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. p. 53-59. 1995.
- 58 GATESOUE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture** v. 180, p. 147-165, 1999.
- 59 GIBBS, P. and GEKAS VASSILIS. **Water activity and microbiological aspects of foods a knowledge base**. <http://www.helfood.com/help/library/helfood-kbo2.ndf> 2001. Consulta Outubro 6/2004.
- 60 GILL, H.S.; RUTHERFORD, K.J.; PRASAD, J. and GOPAL, P.K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). **British Journal of Nutrition** v.83, p.167-176, 2000.
- 61 GIRAUD, E. Contribution a l'etude physiologique et ezimologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolee du mandioc fermente. Thèse Université de Provence aix-Marseille. 139 p., 1992.



- 62 GOBERFISH, L. **Resumen estadístico de la producción de harina de pescado** FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS),1999.
- 63 GULLIAN, M., THOMPSON F. and RODRIGUEZ J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunoestimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** v.233, p.1-14, 2004.
- 64 HAMED, A.S.; BALASUBRAMANIAN, G. Antibiotics resistance in bacteria isolated from *Artemia naupli* and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. **Aquaculture** v.183, p. 195-205, 2000.
- 65 HAMES, J & VOGEL, M. The genus *Lactobacillus* In: WOOD, B.J.B. and HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. v. 2. Ed. Chapman & Hall New York USA 397 p.,1995.
- 66 HANSEN, C.H.R. **Starter culture with added value Bactoform™ F-LC**. Bulletin N° 10, 1999.
- 67 HARPER, C. Chemical resistance of Pathogens in Aquaculture. **Aquaculture Magazine**.Jan-Feb.2002.  
<http://www.aquaculturemaq.com/siteenglis/printed/archives/issues02articles/webharper.pdf>. Consulta 10/10/2004.
- 68 HARRIS, J. M. The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. **Microbiol. Ecol.** v. 25 p.195-231,1993.
- 69 HAVENAR, and R. HUIS In't VELD MJH. Probiotics: a general view. In: lactic acid bacteria in health and disease. Vol. 1 Amsterdam : **Elsevier Applied Science publishers**, 1992.
- 70 HEIZHAO, Z. L; ZHIXUM, G.; YINGYING Y.; WENHUI ZHENG and ZHUOJIA J. L. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Lito penaeus vannamei* Boone. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1441-1447, 2004.

71 HIMABINDU, K.; VENKAT, S; NAROTTAM, P. SAHU,S. and KAMAL, K. J. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de man). **Aquaculture Research**, v. 35 p. 501-507, 2004.

72 HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J. and SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda**, v. 73, n. 2. p. 365S-373S, 2001.

73 HOROWITZ, S. and HOROWITZ, A. **Microbial intervention in aquaculture In: Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems**. Ed. Cheng-Sheng Lee and Pat O'Bryen. Published by World Aquaculture Society, 2002.

74 HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Criobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.

75 INUTA, T.; MATSUMOTO, T.; OGAWA, M.; NAGANUMA, T. **Human Commensal Enteric Bacterium as a Food Additive to Aquatic Nutrition: Application to Processed Feeds for the Japanese Kuruma Prawn, *Masurpenaeus japonicus*, and for the japanese Abalone, *Haliotis Discus***. In: **Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems**. Ed. Lee, C. S. And O' Bryen, P. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, E.U., 2002.

76 ITAMI, T.; M. ASANO; K. TOKUSHIGE; K. KUBONO; A. NAKAGAWA; N. TAKENO; H. NISHIMURA; M. MAEDA; M. KONDO; and Y. TAKAHASHI. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Aquaculture**, v.164, p. 272-288, 1998.

77 JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. R.; HAYFORD, A. E.; MOLLER, P. L.; MICHAELSEN, A.; PAERREGAARD, B.; STANDSTROM, M.; TEVEDE, M. and

JACOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. By *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five select strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 4949-4956. 1999.

78 JOHANSSON, M. W.; SÖDERHÄLL, K. Cellular immunity in crustacean and the proPo system. **Parasitology Today**, v.5, p.171-176, 1989

79 JORY, D. "Use of probiotics in penaeid shrimp growout" **Aquaculture Magazine** , January/ February, p. 62-67,1998.

80 JUAREZ, L. M. ***The Zoea-II Syndrome: A Recently Raconized Problem in Shrimp Hatcheries.*** Tegucigalpa,Honduras.: Asociaci[on Nacional de Aquicultores de Honduras and the Latin American. Chapter of the World Aquiculture Society. 1997.

81 KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

82 KLAENHAMMER, T. R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 12, p. 39-86,1993.

83 KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 311-320. 2004.

84 KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A; and MERSH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of their genotoxicity and affection of waste water bacteria in a simple test. **Chemosphere**, v. 40. p. 701-710. 2004.

85 KURTZ, J. and FRANZ, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, v.425, p.37-38, 2003.

86 L.De VUYST; LEFTERIS MAKRAS; LAZLO AVONTS et, al. Antimicrobial Potential of Probiotic or Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria, the First Results

of the International European Research Project PROPATH of the PROEUHEALTH Cluster. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v.16, p. 125-130, 2004.

87 LARA FLORES, M.; BRIONES, I.; OLVERA NOVOA, M. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). En: CRUZ-SAREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-85 SALAZAR, M.; GAXIOLA-CORTES, M. G. SIMOES, N. Eds. Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 3-6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico.

88 LAVILLA-PITOGO, C.R.; BATICADOS, M.C.L.; CRUZ-LACERDA, E.R. and DE La PEÑA, L. D. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture**, v.91, p. 1-13, 1990.

89 LAVILLA-PITOGO, C. R. and De La PEÑA, L. D. Mortalities of pondcultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminous vibrios in the rearing environment. **Aquaculture**, v. 164, p. 337-349, 1998.

90 LEE, K.K.; YU, S.R. and LUI, P.C. Alkaline serine protease in an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 110-117, 1997.

91 LIGHTNER, D. V. **Hand Book of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 p. 1998.

92 LILLY, B.D.M. and STIWELL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced for micro-organisms. **Science**, v. 147 p. 747-748, 1965.

93 LINDGREN, S. E. and DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentation. **FEMS. Microbiol.**, v. 87, p.149-164, 1990.

- 94 LOWE, J.A. and KERSHAW, S. J. Water activity-moisture content relationship as a predictive indicator for control of spoilage in commercial pet diet components. **Animal Feed Science and Technology**, v. 56, p.187-194, 1995.
- 95 LU, L. and WALKER, W. A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 11245-11305. 2001.
- 96 MACMILLAN, J. R. Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk. **World Aquaculture**, v. 32 n.2, p. 49-51. 2001.
- 97 MACMILLAN, J. R.; SCHNICK, R. AND FORNSHELL, G. **Volume of Antibiotics Sold (2001-2002) in US Domestic Aquaculture Industry.** <http://www://nataquaculture.org/pdf/aetf%20antibiotic%20use%white%paper%206//.03.pdf>. Data de consulta 16/09/2004.
- 98 MAEDA, M. and I. C. LIAO. Microbial processes in aquaculture environment and their importance of increasing crustacean production. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.28, n.4, p. 283-288. 1994.
- 99 MAEDA, M. **Microbial communities an their use in aquaculture In: Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems.** Ed. Lee, C. S. And O' Bryen, P. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, E.U., 2002.
- 100 MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER, C.T. Jr.; SAXMAN, P.R.; FARRIS, R.J.; GARRITY, G. M.; OLSEN, G.J.; SCHMIDT, T.M. and TIEDJE, J.M. The RPD-II (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Res.**, v.29, n.1, 173-174, 2001.
- 101 MALDONADO, M.; RODRÍGUEZ J.; de BLAS, I. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. **Rev. Aquatic**, v. 21, p. 78-91, 2004.
- 102 MANDELL, G. I.; PETRI Jr., W. A. **Antimicrobial agents: general considetarions.** In: **HARDMAN, J.G. and LIMBIRD, L. E.: Goodman and**

**Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics**, 9<sup>a</sup> ed.; International Edition, New York, NY. 1223 p. 1996.

103 MERCADO & PESCA. **Proposta de estratégia setorial sobre resíduos de antibióticos no camarão de cultivo. Documento emitido pelo GAA na European Seafood Exhibition**, Bruxelas, 24 de Abril de 2002. <http://www.mercadopesca.com.br/aquicultura04php> Consulta 08/26/2004.

104 MEZA, R. A; MONROY A. F.; MERCADO M.; POUTOU R.; A; RODRIGUEZ P.; PEDROZA A. M. Study of the stability in real time of cryopreserved strains banks. **Universitas Scientiarum**, v..9, n. 2, p. 35-42. 2004.

105 MINISTERIO DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Programa de Apoio ao Desenvolvimento do Cultivo de Camarão Marinho**. [http://www.adodapesca.com.br/cadeias\\_camarão\\_marinho.php?pag=apresentação](http://www.adodapesca.com.br/cadeias_camarão_marinho.php?pag=apresentação). Consulta 16 /08/2004.

106 MISHRA, C. and LAMBERT, J. Production of antimicrobial substances by probiotics. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 5: 20-24. 1996.

107 MOLINA-Aja. A.; GARCÍA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLAN-MEJÍA, C.; ROQUE, A.; and GÓMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v 213 p. 7-12, 2002.

108 MONTROYA, N.; UYAGUARI, M.; SOTOMAYOR, M. Acumulación de antibióticos y su efecto ante la comunidad bacteriana presente en sedimentos de piscinas camaroneras. **Panorama Aquícola**, v. 8 n. 3 p. 70-73, 2003.

109 MORIARTY, D. J. W. **Disease Control in Shrimp Aquiculture with Probiotic Bacteria. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology**, Halifax, Canada. 1999. [http://ag.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia\\_shrimp/moriarty.pdf](http://ag.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia_shrimp/moriarty.pdf) Consulta 08/17/2004.

- 110 MORICE, M.; BRACQUART, P.; and LINDEN, G. Colonial variation and freeze-thaw resistance of *Streptococcus thermophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p.1197-1203, 1992.
- 111 MOUSRAFA, Y. M EL-NAGGAR. Comparative Study Control the Growth of *Escherichia coli* O 157: H7 and *Salmonella typhimurium*. **Biotechnology**, v.3 n.2, p. 173-180, 2004.
- 112 MUÑOZ, M.; F. VANDENBULCKE; D. SAULINER and E. BACHÈRE. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenge shrimp. **European Journal of Biochemical**, v.269, p. 2678-2689, 2002.
- 113 NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.;BYLUND, G. Protection of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)From Furunculosis by *Lactobacillus Rhamnosus*. **Aquaculture**, v.198, n.4, p. 229-236, 2001.
- 114 NOGA, E.J.; ARROLL, T.A.; FAN, A. Specificity and some physico-chemical characteristic of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. **Fish Shellfish Immunology**, v.6, p. 403-412, 1996.
- 115 NUNEZ, J.P.A and MARTINS, C. P. Avaliando o estado de Camarões Marinhos na Engorda-Parte I e Parte II [www.aqualider.com.brpanoramada aquicultura julho-agosto 2002](http://www.aqualider.com.brpanoramada_aquicultura_julho-agosto_2002). Consulta 16/09/2004.
- 116 NURMI, E. V.; RANTALA, M. "New aspects of Salmonella infection in broiler production" **Nature**, p. 210, 1973.
- 117 NYGAARD, K.; LUNESTAD, B. T.;HEKTOERN, H. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. **Aquaculture**, v.104 p.21-36. 1992.
- 118 OWEHAND, A. C. Antimicrobial components from Lactic Acid Bacteria. In **Lactic Acid Bacteria** ed. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 139-159. New York: Marcel Dekker. 1998.

- 119 PANOFF, J.; THAMMAVONGS, B.; LAPLACE, J.; HARTKE, A.; BOUTUBONNES, P. and AUFFRAY, Y. Criotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* IL. 1403. **Cryobiology**, v. 32 p. 516-520, 1995.
- 120 PANORAMA DE AQUICULTURA. **Mancha Branca em SC. O que está sendo feito pelas autoridades**. v,88, p. 61, 2005.
- 121 PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. **Morphological pathology of the zoea-II syndrome of penaid shirimp**. ALSTON, D. E.; GREEN, B. W. And CLIFFORD, H. C. IV Symposium on aquaculture in Central America: focusing on shirimp and tilapia. p.184-186. 1997.
- 122 PARDO, I.; GARCÍA, M. J.; ZÚÑIGA, M. and URUBURU, F. Evaluation of The API 50 CHL System for Identification of *Leuconostoc oenos*. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.39, n. 4, p. 347-350, 1998.
- 123 PIARD, J. C. and DESMAZEAUD, M. J. Inhibiting Factors Produced by Lactic Acid Bacteria. Bacteriocins and Other Antibacterial Substances. **Lait**, v.72, p.113-142, 1992.
- 124 PLATE, C. A. and LURIA, S. E. Stages in Colicin K Action as Revelated by the Action of Trypsin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 69, p. 2030-2034, 1972.
- 125 RACCACH, M.; Mc GRATH, R. and DAFTARIAN, H. Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* towards *Listeria monocitogenes* . **Int. J. Food Microbiol.**, v. 9, p. 25-32. 1989.
- 126 REID, GREGOR and BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbies and Infecction**, v. 4 p. 319-324, 2002.
- 127 RENGPIPAT, S; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Effects od a probiotic bacterium on black tiger shirimp *Penaeus monodon* surviral and growth. **Aquaculture**, v.167, p. 301-313, 1998.



- 128 RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPON, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p. 271-288, 2000.
- 129 ROBERTSON, P. A.W.; O' DOWD, C.; BURRELLS, C.; WILLIAMS, P. and AUSTIN, B. Use of *Carnobacterium* sp. As a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) **Aquaculture**, v. 185, p. 235-243, 2000.
- 130 RODRIGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v.108, p.1043-1050, 2000.
- 131 RODRÍGUEZ L.; G. BUENO, D.E. RODRÍGUEZ, G. DELGADO, P. SERRANO, M. A. BRIZUELA. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics *in: New Horizons Biotechnology*, 163-172, S. Roussos *et al.* (eds). Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, 2003.
- 132 ROLFE, R. D. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition , Bethesda**, v. 130 347, n° 2, p. 396s-402s, 2000.
- 133 SAHUL HAMEED, A. S.; RAHAMAN, K. H.; ALAGAN, A. ; YOGANANDHAN, K. Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii* . **Aquaculture**, v. 217, p. 39-48, 2003.
- 134 SAITOU, N. and NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, p. 406-425, 1987.
- 135 SAULINER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D. experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, p. 133-144, 2000.
- 136 SCHLEIFER, K. H.; AMANN, L.R.; HARTEL, C.; EHRMANN, M.; KOHLER, W.; KAUSE, A. Phylogenetic relationships of acid lactic bacteria and their identification

with nucleic acid probes, In **Lactic Acid Bacteria. Research and industrial applications in the agro-food industries.** p: 23-32,1991

137 SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda,** v.73, n.2, p. 361S-364S,2001.

138 SELVIN, J. and LIPTON, A.P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Disease of Aquatic Organisms,** v. 57, p. 147-150, 2003.

139 SELVIN, J.; HUXLEY, A.J. and LIPTON, P. Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. **Aquaculture,** v. 230, p. 2421-248, 2004.

140 SHAH, P. N. Functional Foods from Probiotics and Prebiotics. **Food Technology,** v. 55 n.11, p.46-55, 2001.

141 SIMOES, N.; JONES, D.; SOTO-RODRIGUEZ, S.; ROQUE, A. & GOMEZ-GIL, B. Las bacterias en el inicio de la Alimentación Exógena en Larvas de Camarones Peneidos: Efectos de la Calidad del Agua, Tasas de Ingestión y Rutas de Colonización del Tracto digestivo. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del Sexto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 3-6 Septiembre, p.243-276, 2002.

142 SIMPSON, W. J. and TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. p. 125-172. In: B.J.B. WOOD and W.H. HOLZAPFEL (eds.) **The genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, London,1995

143 SOULAP, E. **Nuevas alternativas de cultivos acuícolas.** 1 Ed. Guayaquil, Ecuador Ed. Ener Soulap, 442 p., 1999.

144 STYER, L. **Bioquímica.** Terceira edição , Guanabara, Rio de Janeiro, 881 p.1992.

- 145 SUBASINGHE, R. Fish health and quarantine ,p 45-49. *In Review of the State of the World Aquaculture*. FAO Fisheries circular No 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome Italy.1997.
- 146 SUGITA, H.; OKANO, R.;SUZUKI,Y. et al. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile japanese flounder against fish pathogens. **Fisheries science**, v. 68, p. 1004-1011,2002.
- 147 SUNG, H.H.; YANG, Y.L.; SONG, Y.L. Enhancement of microbicidal activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunoestimulation. **J. crustacean Biology**, v.16, p. 278-284,1996 a.
- 148 TAGG, J. R. and MC. GIVEN, A.R. Assay sistem for bacteriocins. **Applied Microbiol.**, v. 21, p. 943. 1971.
- 149 TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 41, n. 3, p. 722-756,1976.
- 150 TANAKA, S.; H. AOKI; Y, SHIMIZU; S. IMANISHI and I. OKAMOTO. Studies on the iridovirus infection of cultured red sea bream, *Bagrus major* and preventions. **Bulletin of Fisheries Research Institute of Mie.**, v. 6, p. 55-61, 1996.
- 151 TEO, J.W.P; TAN, T.M.C. and POH, C.L. Genetic Determination of Tetracycline Resistance in *Vibrio*. Antimicrob. **Agents Chemother.**, v.4, n. 46, p. 1038-1045, 2002.
- 152 TSENG, CH. & MONTVILLE,T. J. Metabolic regulation and distribution in *Lactobacillus*. Causes and consequences. **Biotechnol.**, v. 9, p.113-121,1993.
- 153 VALLE , J. C.; TORRES, A.; SAN MIGUEL, L. Y HARO, G. Efecto Timsen sobre la carga de *vibrios spp*. En el cultivo de camarón. **Panorama Aquícola**, v. 8 n. 1, p. 52-53. 2002.

- 154 VARGAS-ALVORES, F. Y BARRACO, M. A. Mecanismos de Defensa de los Moluscos Bivalvos, con énfasis en Pectinidios. In: **Los moluscos Pectinidios de Iberoamerica: Ciencia y acuicultura**. A.N. Maeda-Martínez (ed.) 2001, Cap. 7, p. 127-146.
- 155 VERSCHUERE, L.; ROUMBAUT, G.; SORGELOOS, P. and VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.
- 156 VILLAMIL, L.; FIGUERAS, A.; PLANAS, M.; NOVOA, B. Control fo *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. **Aquaculture**, v.219, p. 43-36, 2003.
- 157 WANG, R.: M, LIANG; M. HALL and K. SÖDERHALL. A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localization and cDNA cloning. **Fish & Shellfish Immunology**, v.11, p. 623-637, 2001.
- 158 WILLET, H. P. Metabolismo energético, Joklik, W. K. Willet. H. P. Amos, D. B. Ed. Zinsser. **Microbiología**, 18 Ed. Buenos Aires, 558 pp.1989
- 159 WOOD, B. J. B. & HOLZAPFEL, W.H. Eds. The genera of lactic acid bacteria, vol. 2 Aspen Publishers Gaithersburg. MD. P.398 ,1995.
- 160 YIMIN, C; YOSHIMI, B; TAKASHI, N. and TAE-KWANG, O. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v 4. n.4, p. 311-316, 1998.
- 161 YIMIN, C.; PUANGPEN, S.; PREMSUDA, S. And YOSHIMI, B. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. **J. Gen Appl. Microbiol.**, v. 45, p.. 177-184, 1999.
- 162 YOONG, B.F.and REINOSO, N.B. **Manual práctico para la identificación de Post-larvas y juveniles de cuatro especies de camarones marinos**. Instituto

Nacional de Pesca. Boletín Científico y técnico Guayaquil Ecuador, v. 6 n. 2. 1989.